



**HAL**  
open science

# Procédé de phytoextraction couplé à la bioaugmentation d'un sol agricole polycontaminé par du chrome, du mercure et du plomb

Armelle Braud

## ► To cite this version:

Armelle Braud. 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, 2007. Français. NNT : . tel-00465806

**HAL Id: tel-00465806**

**<https://theses.hal.science/tel-00465806>**

Submitted on 22 Mar 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE HAUTE-ALSACE

Discipline : Biologie des Organismes

Présentée et soutenue publiquement par :

Armelle BRAUD

Le 6 juillet 2007

Procédé de phytoextraction couplé à la  
bioaugmentation d'un sol agricole polycontaminé  
par du chrome, du mercure et du plomb

**JURY**

M. Michel MENCH  
M. Jean-Louis MOREL  
M. Emile BENIZRI  
Melle Karine JEZEQUEL  
Mme Isabelle SCHALK  
M. Thierry LEBEAU

INRA, Bordeaux  
ENSAIA-INRA/INPL, Nancy  
ENSAIA-INRA/INPL, Nancy  
EDBS/UHA, Colmar  
ESBS-CNRS, Strasbourg  
EDBS/UHA, Colmar

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de Thèse



# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse M. Thierry LEBEAU, Professeur à l'IUT de Colmar et directeur de l'Equipe Dépollution Biologique des Sols (EDBS) ainsi que M<sup>elle</sup> Karine JEZEQUEL, Maître de conférence à l'IUT de Colmar, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse, pour leur soutien, leur générosité et leurs judicieux conseils au long de ces quatre années.

Je remercie M. Pierre EHRBURGER pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire Gestion des Risques et Environnement (GRE).

Merci à M. Michel MENCH, M. Jean-Louis MOREL, M. Emile BENIZRI et M<sup>me</sup> Isabelle SCHALK pour avoir accepté de composer ce jury.

Je remercie M. Stéphane BAZOT, post-doctorant dans l'équipe EDBS, qui a participé aux études de survie des microorganismes dans le sol.

Je remercie également tous les stagiaires qui ont participé à ce projet : Emilie VIEILLE, Marie-Anne LEGER, Adrien TRITTER, Saad BOUMAAZA, Abderrachid EL KHATABI.

Je remercie les équipes impliquées dans ce projet financé par l'ACI (Action Concertée Incitative) Non Pollution/Dépollution N°24 :

- M. Philippe BERTIN, M<sup>me</sup> Florence PLOETZE et M<sup>elle</sup> Emilie MULLER du laboratoire Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie (UMR 7156, ULP).
- M<sup>me</sup> Michèle TREMOLIERES du Centre d'Ecologie Végétale et d'Hydrogéologie (UMR-MA 101, ULP/ENGEES).
- M<sup>me</sup> Anne-Marie ALBRECHT-GARY et M. Mourad ELHABIRI du laboratoire de Physico-Chimie Bioinorganique (UMR 7509, CNRS/ECPM).
- M. Serge NEUNLIST et M<sup>elle</sup> Lucie ESVAN du laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique (UMR 7015, CNRS/ENSCMu).

Je remercie également :

- M<sup>me</sup> Damaris KEHRLI et M<sup>elle</sup> Virginie LAFON du GRE pour leur participation aux analyses chimiques des métaux.
- M. DIELS de VITO (Institut flamand de recherche technologique, Belgique) pour nous avoir fourni la souche de *Ralstonia metallidurans* CH34 ATCC 43123.
- La Mission Recyclage Agricole (MRA68) de Colmar pour nous avoir fourni les données sur les sols pollués en Alsace et le prêt du GPS.
- L'équipe technique de l'IUT, Annie et Jean-Marie LASSALLE pour le prêt de matériel et les nombreux services rendus.
- L'équipe du CRITT RITTMO : M<sup>me</sup> Corinne BITAUD, M<sup>me</sup> Najat NASSR, M<sup>me</sup> Laure METZGER, M<sup>me</sup> Myriam SADIR et M. Ludovic FAESSEL, pour leur soutien technique et leurs conseils.
- Mme Pascale MAILLOT, Mme Claude ERNY et Mme Catherine DEMUYTER du LVBE pour leur aide, notamment pour l'utilisation du Bioscreen C.

# SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE I : Etude bibliographique .....</b>	<b>4</b>
1. Présence d'éléments traces métalliques dans les sols agricoles .....	5
1.1. Etat des lieux des sols agricoles français .....	5
1.2. Spéciation des métaux dans le sol .....	8
1.3. Paramètres physico-chimiques influençant la mobilité des métaux dans le sol.....	11
1.4. Contamination des sols par le Cr, le Hg et le Pb.....	13
1.5. Les métaux dans les sols alsaciens.....	18
2. Les techniques de dépollution du sol .....	22
2.1. Méthodes physico-chimiques.....	22
2.2. Méthodes biologiques .....	22
2.3. Phytoremédiation .....	49
3. Phytoremédiation couplée à la bioremédiation.....	74
3.1. Fonctionnement de la rhizosphère .....	74
3.2. Ingénierie de la rhizosphère appliquée à la phytoextraction.....	79
<b>PARTIE II : Matériel et Méthodes .....</b>	<b>86</b>
1. Description du site d'étude .....	88
1.1. Prélèvement des échantillons de terre et pré-traitement .....	88
1.2. Méthodes analytiques .....	89
2. Caractéristiques des microorganismes étudiés.....	94
2.1. Souches étudiées et conditions de culture.....	94
2.2. Méthodes de dénombrement de la biomasse microbienne.....	95
2.3. Tests de résistance aux métaux .....	96
2.4. Méthodes de détection des métabolites microbiens .....	98
3. Caractéristiques des plantes étudiées et analyses.....	100
3.1. Plante modèle des études en laboratoire : maïs.....	100
3.2. Analyse des teneurs en métaux dans les végétaux .....	100
4. Présentation et description des plans d'expérience.....	101
4.1. Etude de la spéciation du Cr et du Pb dans des microcosmes de sol bioaugmentés.....	101
4.2. Optimisation de l'activité des sidérophores .....	102
4.3. Etude de la survie des microorganismes inoculés dans le sol.....	106
4.4. Etude de la phytoextraction couplée à la bioaugmentation.....	108
4.5. Analyses statistiques des résultats.....	110

<b>PARTIE III : Résultats et discussion.....</b>	<b>112</b>
1. Caractéristiques des sols d'étude et du matériel biologique.....	114
1.1. Description du site d'étude.....	114
1.2. Caractéristiques des microorganismes .....	119
2. Etude de la spéciation du Cr et du Pb en microcosmes de sol après bioaugmentation.....	123
2.1. Analyses du pH et du potentiel redox (Eh).....	123
2.2. Analyses microbiologiques .....	125
2.3. Spéciation métallique .....	131
2.4. Analyse globale des facteurs régissant la phytoextraction des métaux .....	138
3. Optimisation de la production de sidérophores .....	140
3.1. Influence de la source carbonée sur la production de sidérophores.....	140
3.2. Biais du test CAS en présence de métaux.....	146
3.3. Influence des substrats et des métaux sur la production de sidérophores.....	151
3.4. Influence de la co-immobilisation de cellules bactériennes et de substrats sur la production de sidérophores, en présence de métaux .....	157
4. Test de phytoextraction sur sable/perlite .....	167
4.1. Production de biomasse.....	167
4.2. Extraction de métaux.....	168
5. Test de phytoextraction en microcosmes de sol .....	174
5.1. Cinétique de phytoextraction .....	174
5.2. Optimisation de la survie des microorganismes inoculés .....	176
5.3. Phytoextraction couplée à la bioaugmentation du sol agricole.....	186
 <b>Conclusion .....</b>	 <b>210</b>
 <b>Références bibliographiques.....</b>	 <b>215</b>
 <b>Annexes .....</b>	 <b>245</b>
 <b>Tables des sigles et abréviations.....</b>	 <b>250</b>
 <b>Glossaire .....</b>	 <b>252</b>
 <b>Valorisation scientifique.....</b>	 <b>253</b>

# INTRODUCTION

La contamination métallique des sols agricoles français résulte des activités agricoles par l'application de produits phytosanitaires, d'engrais inorganiques et organiques mais également dans certaines situations de dépôts atmosphériques ou de contaminations accidentelles. Ces contaminations, souvent ignorées et/ou sous-estimées, commencent à être prises en compte au travers de programmes de surveillance de la qualité des sols agricoles, mis en place depuis quelques années (Darmendrail *et al.* 2000), notamment par le RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols). Le vide législatif au niveau français et européen est à l'origine de la méconnaissance de l'ampleur de la contamination de ces sols agricoles, d'autant plus que le risque de contamination de la chaîne alimentaire est réel, voire avéré dans certains cas (Dudka et Miller 1999). En Allemagne, par exemple, plusieurs dizaines de milliers d'hectares devraient être soustraits à l'activité agricole, même en se basant sur les seuils les plus bas édictés par la réglementation, et plusieurs centaines de milliers d'hectares sont concernés en Europe et aux Etats-Unis (Lewandowski *et al.* 2006).

Les sols agricoles, dont les teneurs en métaux demeurent néanmoins modérées en comparaison des sites et sols industriels pollués, peuvent être traités par des procédés biologiques, adaptés à la remédiation de grandes surfaces, telle que la phytoremédiation. Plusieurs approches peuvent être envisagées, dont l'immobilisation du polluant métallique par phytostabilisation. Cependant, cette technique, par ailleurs couramment appliquée pour les terrils miniers, empêcherait les agriculteurs d'exploiter les parcelles contaminées, ce qui n'est pas envisageable. La phytoextraction est par conséquent la seule technique permettant d'extraire *in situ* les métaux et de permettre la reprise de l'activité agricole après traitement. C'est par ailleurs une technique « douce » qui ne nuit pas à l'activité biologique du sol et qui est économiquement intéressante par rapport aux techniques physico-chimiques (Lewandowski *et al.* 2006)

Un des inconvénients majeurs de la phytoextraction est le temps de décontamination qui peut parfois atteindre plusieurs dizaines d'années en fonction du type de plante utilisé et de leur vitesse de croissance, de la nature de la pollution et des propriétés du sol qui influencent la disponibilité des métaux à disposition de la plante (McGrath *et al.* 2002; McIntyre 2003). Plusieurs études se sont intéressées à l'augmentation de la vitesse de phytoextraction, soit en améliorant les capacités de la plante par manipulation génétique, soit en augmentant la mobilité des métaux dans les sols, l'un des facteurs limitants majeurs pour l'efficacité de la phytoextraction, par ajout de chélatants synthétiques (Karenlampi *et al.* 2000; Nascimento et Xing 2006). Cependant, certains composés chimiques, tel que l'EDTA, engendrent des effets

néfastes sur la microflore et la microfaune du sol, ainsi qu'un risque de lixiviation des métaux (Grčman *et al.* 2001; Romkens *et al.* 2002).

Une nouvelle technique en émergence, la rhizoremédiation, qui associe la bioaugmentation et la phytoextraction peut permettre d'augmenter les performances de la phytoextraction. Cette technique consiste à inoculer le sol avec des microorganismes rhizosphériques ou non rhizosphériques, et à cultiver des plantes accumulatrices ou hyperaccumulatrices. Jusqu'à présent, la rhizoremédiation a surtout été employée dans le but d'augmenter la biomasse des végétaux inoculés grâce aux métabolites produits par les microorganismes bioaugmentés. Quelques auteurs se sont récemment intéressés au rôle des microorganismes inoculés sur la spéciation de métaux dans un sol contaminé, et à l'impact sur le prélèvement de ces métaux par les plantes (Glick 2003; Khan 2005; Wang *et al.* 2007; Whiting *et al.* 2001a).

Notre étude porte sur un sol agricole alsacien polycontaminé par du chrome (488 mg/kg sol sec), du mercure (15 mg/kg sol sec), et du plomb (381 mg/kg sol sec). Cette contamination, conséquence de l'inondation répétée des terres par des effluents industriels fortement contaminés, est largement supérieure aux teneurs en métaux autorisées dans les sols agricoles pour pouvoir épandre des boues d'épuration.

L'objectif du travail a consisté en l'étude de l'impact de l'inoculation d'un sol agricole par des microorganismes préalablement sélectionnés, sur l'efficacité de la phytoextraction par une plante modèle, le maïs. Les microorganismes ont été sélectionnés pour leur capacité potentielle à augmenter la fraction de métaux mobilisables par le maïs, grâce à la production de métabolites tels que les organiques, les biosurfactants ou les sidérophores.

Les microorganismes utilisés ont tout d'abord été sélectionnés pour leur résistance aux métaux puis pour leur capacité à mobiliser le Cr, le Hg et le Pb dans deux sols ayant des niveaux de contamination en métaux différents. La production de sidérophores a ensuite été optimisée avant de tester les couplages plante-microorganismes. Ces tests ont été réalisés *in vitro* sur un mélange sable/perlite stérilisé, dans un premier temps, de façon à évaluer l'impact de la bioaugmentation sur la phytoextraction dans des conditions favorables (substrat synthétique dopé en métaux). Puis les expériences ont été conduites dans le sol d'étude (non stérilisé et non dopé en métaux). Dans le but d'augmenter à la fois la survie des microorganismes inoculés dans le sol ainsi que la production des métabolites d'intérêt, différentes formulations ont été proposées et testées : des suspensions microbiennes (microorganismes dits libres) et des microorganismes immobilisés dans des billes d'alginate de calcium avec ou sans substrat.





---

PARTIE I : ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE

---

# 1. Présence d'éléments traces métalliques dans les sols agricoles

## 1.1. Etat des lieux des sols agricoles français

### 1.1.1. Nature et origine des pollutions métalliques

**Pollutions localisées vs. pollutions diffuses :** la plupart des sites contaminés recensés à ce jour sont d'anciens sites industriels où la contamination métallique des sols est souvent importante en terme de concentration mais circonscrite à de petites surfaces. Il s'agit de pollutions localisées. En 2004, près de 500 000 sites contaminés, essentiellement industriels, étaient recensés en Europe de l'Ouest, dont 3800 en France (Agence européenne pour l'environnement 2005). Les métaux recensés sur les sites contaminés européens, principalement Cd, Cu, Pb et Zn, ont tendance à s'accumuler dans les sols, ce qui engendre un risque potentiel et parfois avéré de contamination des eaux souterraines et de la chaîne alimentaire (van Driel et Smilde 1990).

A l'opposé, les pollutions diffuses relèvent de sols moins contaminés que ceux des sites industriels, mais elles concernent des surfaces plus importantes. Tel est le cas des sols agricoles dont plusieurs centaines de milliers d'hectares seraient concernés en Europe (plus de 10 000 ha en Allemagne) et aux Etats-Unis (Lewandowski *et al.* 2006). La contamination métallique des sols agricoles est principalement due aux dépôts atmosphériques, à l'utilisation de produits phytosanitaires, d'engrais et/ou à l'épandage de déchets organiques (**tableau I.1**) (He *et al.* 2005). Les entrées en métaux, *via* les intrants, sont désormais fortement réglementées, limitant ainsi leur accumulation, ce qui n'était pas le cas dix ans plus tôt.

**Tableau I.1 :** Activités représentant les principales sources de contamination des sols agricoles français par des métaux (CTP 2001).

Elément	Cd	Cu	Pb	Zn
Quantité totale émise (t/an)	68	5300	8300	3200
Déchets urbains	7%	5%	3%	28%
Déchets agricoles	—	19%	—	70%
Engrais et phytosanitaires	89%	76%	—	—
Retombées atmosphériques	4%	—	97%	2%

Les entrées de contaminants métalliques peuvent être classées en deux catégories :

**Les entrées indépendantes de l'activité agricole** : il s'agit d'une part des retombées atmosphériques d'origine naturelle telles que l'érosion des sols et les éruptions volcaniques, qui sont responsables de l'émission d'environ 112 t de Hg/an au niveau mondial (Nriagu et Becker 2003). D'autre part, diverses activités humaines (usines d'incinération, hauts fourneaux, production de briques, combustion de charbon et de pétrole, circulation automobile) sont responsables de l'émission de métaux (**tableau I.2**) (Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement 1996). Depuis une dizaine d'années les émissions de métaux dans l'atmosphère ont régressé du fait d'une législation plus stricte. Par exemple, les émissions atmosphériques de Hg et de Pb en France ont été divisées respectivement par 6 et 3 entre 1986 et 1994 (Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement 1996).

**Tableau I.2** : Retombées atmosphériques en métaux liées aux activités anthropiques en France en 1994 (g/ha/an). (1) (Ministère de l'environnement 1996) ; (2) (Juste *et al.* 1995).

Elément	Retombées liées à l'industrie (1)	Retombées liées à l'automobile (2)
Cd	0,05	5,7
Cu	-	60
Hg	0,07	-
Ni	-	35
Pb	1,29	1055
Zn	1,06	843

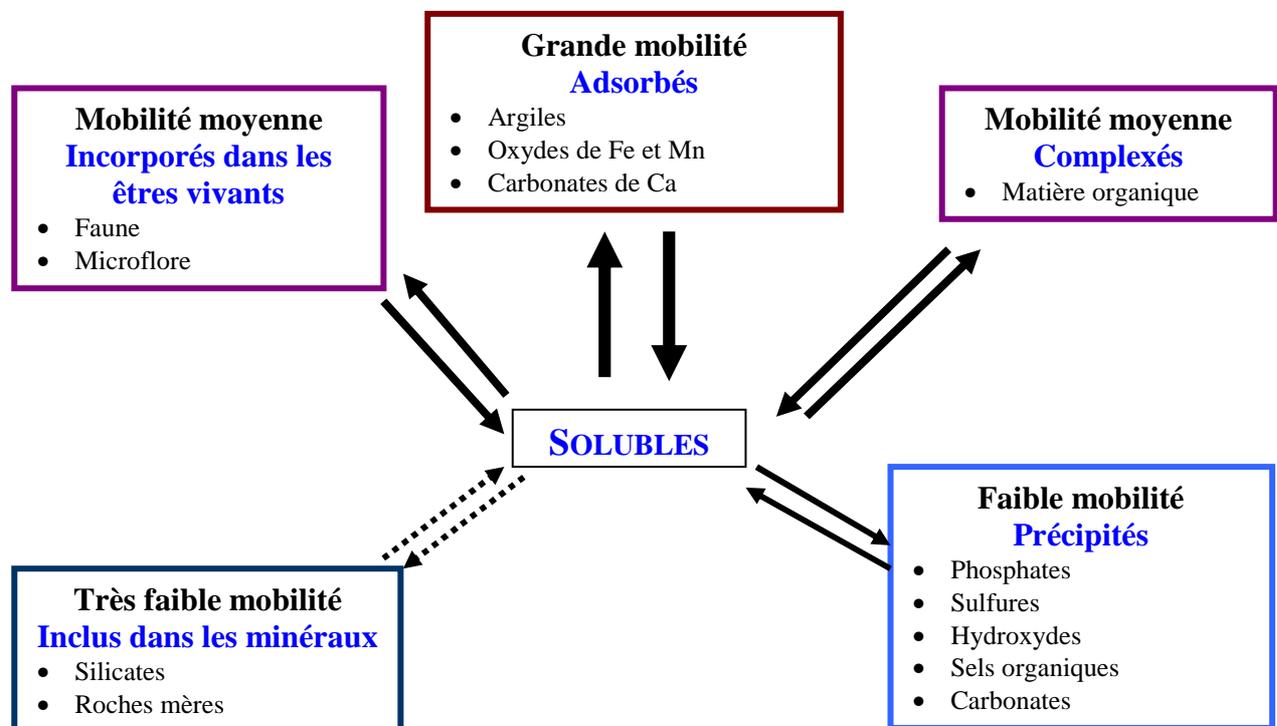
**Les entrées liées à l'activité agricole** concernent par exemple l'utilisation de **produits phytosanitaires** dans les vignobles, qui a contribué à l'accumulation de Cu dans les sols dont certains en contiennent plus de 500 mg/kg (Robert et Juste 1998). Certains pesticides longtemps employés dans les vergers et les vignes, à base d'arséniate de plomb ou de composés organo-mercuriques, ont aussi conduit à la pollution des sols en As, Hg et Pb (Robert et Juste 1998). Les apports de **matières fertilisantes** et les amendements, qu'ils soient organiques ou minéraux, constituent également une source importante de métaux dans les sols agricoles. L'apport d'engrais phosphatés, par exemple, contribue à l'enrichissement des sols en cadmium dont les teneurs varient selon l'origine géographique des phosphates (Robert et Juste 1998). C'est également le cas du Co, Cr, Mn, Ni et Zn présents sous forme d'impuretés dans les engrais (Bourrellet et Berthelin 1998).

**Tableau I.3** : Valeurs seuils et d'investigation en métaux dans les sols agricoles servant de référence pour le recyclage des boues de STEP (Baize 1997).

Elément (mg/kg sol sec)	Valeur seuil avant épandage des boues (arrêté 8 janvier 1998)	Proposition pour un seuil d'investigation (programme ASPITET *)	Valeurs limites en vigueur en UE (**)
Cd	2	0,7	1-3
Co	30	30	100-150
Cr	150	100	50-140
Cu	10	35	1-1,5
Hg	1	—	—
Ni	50	70	30-75
Pb	100	60	50-300
Zn	300	150	150-300

(\*) Apport d'une stratification pédologique pour l'étude des teneurs en éléments traces.

(\*\*) Teneurs minimales pour la Suède et le Danemark et maximales pour le Royaume-Uni.



**Figure 1.1** : Mobilité des métaux dans le sol (Juste *et al.* 1995).

Les **amendements organiques** tels que le fumier, les boues de curage, les boues de station d'épuration (STEP), les composts et les déchets industriels peuvent enrichir les sols en métaux suite à des ajouts répétés, notamment en Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn (Chang *et al.* 1984). L'effet à long terme d'application de boues de STEP sur les cultures et la qualité agronomique des sols a fait l'objet de plusieurs études (Chang *et al.* 1984; Juste et Mench 1992). Plus spécifiquement, une étude de McGrath *et al.* (1995) montre que 20 ans après l'arrêt d'épandage de boues de STEP, les métaux qui s'étaient accumulés dans le sol (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) affectaient encore la fixation de N<sub>2</sub> par les *Rhizobium* symbiotiques du trèfle.

### 1.1.2. Réglementation et surveillance des sols

L'épandage agricole des boues est réglementé par le décret N° 97-1133 du 8 décembre 1997 et l'arrêté d'application du 8 janvier 1998. En l'absence d'une réglementation française spécifique au sol, l'arrêté du 8 janvier 1998 impose des teneurs limites en métaux au delà desquelles l'épandage de boues de STEP n'est pas autorisé (**tableau I.3**). Une directive cadre européenne relative à la pollution des sols a été proposée le 22 septembre 2006 mais son adoption n'est pas prévue avant 2008 (Papoulias 2006).

La nécessité de surveiller la qualité des sols agricoles français a donné lieu à la création de différents programmes de surveillance menés par l'INRA, l'ADEME et le BRGM, dont les plus récents – Quasar (Qualité des Sols Agricoles et des Récoltes) et RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols) – sont en cours de réalisation (Darmendrail *et al.* 2000).

## 1.2. Spéciation des métaux dans le sol

La connaissance des formes physico-chimiques des éléments est nécessaire pour comprendre leur devenir dans l'environnement. Les différentes formes des éléments résultent de liaisons spécifiques (liaisons covalentes ou de coordination) ou aspécifiques (échanges d'ions), l'affinité de liaison dépendant de la nature chimique du contaminant, de la surface d'adsorption, et des conditions physico-chimiques du milieu. Les métaux sont répartis dans différentes fractions du sol selon leur mobilité, le compartiment ultime étant représenté par la solution de sol (Juste *et al.* 1995) (**figure 1.1**).

La matière organique particulaire grossière et les particules argileuses organo-minérales sont les fractions majeures auxquelles sont liés les métaux dans le sol (Balabane *et al.* 1999). L'adsorption sur les oxy-hydroxydes de Fe et Mn a été mise en évidence par la forte corrélation entre les teneurs en Fe, Mn et les teneurs en Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn dans le sol (Baize 2000).

Dans le cas des sols formés à partir d'une roche mère riche en métaux, la concentration en éléments métalliques augmente avec la profondeur (Juste *et al.* 1995). En revanche dans les sols agricoles, les métaux accumulés après épandage de boues ne migrent pas vers les couches

profondes du sol mais restent dans la couche labourable (0-30 cm) (Chang *et al.* 1984; Michelin *et al.* 2002).

La distribution des métaux dans le sol est estimée grâce à des méthodes d'extractions séquentielles et la fraction **bioaccessible**\* est évaluée par des extractions chimiques simples (Allen et Yin 1998).

### 1.2.1. Estimation de la distribution des métaux dans le sol

Les schémas d'extraction séquentielle les plus utilisés sont ceux de Tessier *et al.* (1979) et du BCR (Bureau Communautaire des Références) (Filgueiras *et al.* 2002; Ure *et al.* 1993; Wang *et al.* 2003). Ces méthodes ont néanmoins pour inconvénient la non sélectivité des extractants vis à vis des différentes formes de métaux et le risque de redéposition des métaux lors des phases d'extraction (Kheboian et Bauer 1987; Wang *et al.* 2003). L'efficacité de l'extraction dépend du pH, de la concentration de l'extractant utilisé, du temps d'extraction, de la température et des propriétés physico-chimiques du sol (Kalembkiewicz et Socco 2002; McLaren 1998). Le pré-traitement de l'échantillon, notamment la granulométrie obtenue après tamisage et la température de séchage de l'échantillon de sol à analyser, jouent un rôle important dans la spéciation métallique. Kalembkiewicz et Socco (2002) recommandent une taille de grain inférieure ou égale à 250 µm pour l'extraction séquentielle du Cr et une température optimale de séchage du sol de 20-30°C.

L'extraction séquentielle de Tessier *et al.* (1979) est la méthode qui s'est révélée être la plus efficace en terme de pourcentage d'extraction de Cr et de Pb dans le sol, comparativement aux méthodes du BCR et de Shuman (1985) (Tritter 2004). Plusieurs études comparatives ont également montré que les réactifs utilisés par la méthode de Tessier permettaient d'extraire plus de Pb dans le sol et les sédiments que la méthode du BCR (Lopez-Sanchez *et al.* 1993; Raksataya *et al.* 1996).

Les métaux du sol extraits selon la méthode de Tessier *et al.* (1979) sont répartis dans les fractions suivantes :

- Fraction échangeable (F1) : les espèces métalliques sont sous forme d'ions libres ou fixées aux particules de sol par des liaisons de faible énergie ;
- Fraction liée aux carbonates (F2) : les métaux sont associés aux carbonates ou adsorbés spécifiquement ;
- Fraction liée aux oxydes de fer et de manganèse (F3) : les espèces métalliques sont complexées avec des oxy-hydroxydes métalliques ;

---

\* Voir glossaire

- Fraction liée à la matière organique (F4) : les métaux sont complexés par des sulfures ou par des substances organiques de la phase soluble (acides fulviques, organiques, acides aminés, composés phénoliques) ou de la phase solide (acides humiques), ou encore incorporés dans les organismes vivants (végétaux, animaux, microorganismes) ;

- Fraction résiduelle (F5) : cette fraction métallique est contenue dans les silicates, la matière organique récalcitrante et certains oxydes.

En général la mobilité des métaux dans les différentes fractions diminue dans l'ordre suivant : échangeable > liée aux carbonates > liée aux oxydes de Fe et Mn > liée aux composés organiques et sulfures > résiduelle (Li et Thornton 2001).

Les méthodes d'analyse de la distribution du mercure dans le sol sont à part dans la littérature du fait des propriétés chimiques particulières de ce métal, rendant les méthodes de spéciation classiques inadaptées à ce métal (Wallschlager *et al.* 1998). Les acides humiques et fulviques du sol, qui représentent une fraction importante dans la spéciation du mercure, ne peuvent être déterminés par des schémas de spéciation classique (Giulio et Ryan 1987; Wallschlager *et al.* 1998). Une étude comparative de Sánchez *et al.* (2005) a montré que la méthode de spéciation de Giulio et Ryan (1987) donnait les meilleurs rendements d'extraction sur des échantillons de sol.

La méthode de Giulio et Ryan (1987) permet d'extraire le mercure selon 5 fractions :

- F1 : fraction extractible à l'eau ;
- F2 : fraction échangeable ;
- F3 : fraction liée aux acides humiques et/ou fulviques ;
- F4 : fraction liée à la matière organique et aux sulfures ;
- F5 : fraction résiduelle.

### 1.2.2. Estimation des fractions bioaccessibles et biodisponibles.

Concernant la disponibilité des métaux dans le sol, il faut distinguer deux fractions. La **fraction bioaccessible** représente la fraction métallique échangeable que l'on extrait du sol par des méthodes physiques ou chimiques, cette fraction est potentiellement biodisponible pour les microorganismes (voir **figure 1.5** p 25). La **fraction biodisponible** représente la fraction soluble des métaux qui peut traverser la membrane des organismes biologiques du sol (Semple *et al.* 2004).

Les extractions simples sont plus rapides et moins coûteuses que les extractions séquentielles, mais elles ne renseignent pas sur les associations entre les métaux et les différentes fractions du sol (Tack et Verloo 1995).



Pour les extractions simples en une seule étape, les extractants les plus couramment utilisés sont l'eau distillée, le DTPA\*, le NaNO<sub>3</sub>, ou le CaCl<sub>2</sub> (Chen et Cutright 2001; Gupta et Aten 1993). L'extraction avec un mélange d'acides organiques de faible poids moléculaire donne des résultats supérieurs en terme d'efficacité d'extraction, par rapport à ceux obtenus par la méthode du BCR pour la fraction échangeable, qui utilise l'acide acétique à 0,11 M (Wang *et al.* 2003). Une méthode en particulier utilise un mélange d'acide acétique, lactique, citrique, malique, et formique, pouvant mimer l'action des exsudats racinaires sur la mobilité des métaux (Feng *et al.* 2005).

La concentration en métal ionique libre dans la solution de sol est, selon plusieurs études, un bon indicateur du prélèvement du métal par les végétaux, c'est à dire de la biodisponibilité des métaux (Checkai *et al.* 1987; Csillag *et al.* 1999). La récupération de cette solution par centrifugation est une manière d'estimer cette biodisponibilité (Csillag *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2001). Cette dernière nécessite cependant un pourcentage d'humidité du sol supérieur à 80%.

### 1.3. Paramètres physico-chimiques influençant la mobilité des métaux dans le sol

La mobilité des métaux dans le sol est régie par différentes réactions d'origine abiotiques et biotiques : solubilisation/insolubilisation, adsorption/désorption, mécanismes de mobilisation/immobilisation des métaux par dissolution/précipitation, dispersion/floculation. Les paramètres édaphiques qui régissent ces réactions sont : les conditions acido-basiques, d'oxydoréduction, la présence et la nature de ligands organiques et minéraux, la présence et la nature des colloïdes minéraux et organiques, la présence et l'activité des microorganismes (Berthelin et Leyval 2000; Hesterberg 1998) (**tableau I.4**).

Le **pH** est un des facteurs déterminants de la mobilité des métaux. La diminution du pH favorise la mobilité de la plupart des métaux par la mise en solution des sels métalliques ou la destruction de la phase de rétention. L'arrêté du 08 janvier 1998 n'autorise d'ailleurs pas l'épandage de boues urbaines sur des sols de pH inférieur à 6.

**Le potentiel d'oxydoréduction (Eh)** dépend du degré d'aération du sol, des pratiques culturales et des conditions climatiques. En conditions anoxiques, les composés ferriques et manganiques sont plus solubles et libèrent les métaux qui leurs sont associés. En revanche en conditions aérobies, les oxydes de Fe et Mn étant peu solubles, ils immobilisent les métaux (Deneux-Mustin *et al.* 2003).

---

\* Voir table des abréviations

**Tableau I.4** : Influence des propriétés du sol sur la mobilité des métaux (Berthelin et Leyval 2000).

Propriétés du sol	Effets fondamentaux	Effets sur la mobilité
pH faible	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminution de l'adsorption des cations</li> </ul>	↗
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de l'adsorption des anions sur les oxydes de Al, Fe, Mn</li> </ul>	↘
pH élevé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la précipitation des cations sous forme de carbonates et hydroxydes</li> <li>• Augmentation de l'adsorption des anions sur les oxydes métalliques</li> <li>• Augmentation de l'adsorption des cations par des composés humiques</li> </ul>	↘
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la complexation de certains cations par des ligands solubles</li> <li>• Diminution de l'adsorption des anions</li> </ul>	↗
Potentiel redox	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminution de la solubilité à faible Eh sous forme de sulfure, si présence de sulfates</li> </ul>	↘
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la solubilité des oxydes divalents comparativement aux trivalents.</li> </ul>	↗
Présence de ligands organiques et minéraux en solution	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la solubilité des métaux</li> </ul>	↗
Teneurs élevées en argile	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de l'échange d'ions pour les cations en traces</li> </ul>	↘
Présence d'oxydes d'Al, Fe, Mn	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de l'adsorption des cations métalliques traces avec l'augmentation du pH</li> <li>• Augmentation de l'adsorption des anions traces avec la diminution du pH</li> </ul>	↘

**La CEC (capacité d'échange cationique)** caractérise la capacité d'un sol à stocker et à restituer les éléments minéraux : les particules fines d'argile, à forte CEC, sont chargées négativement et adsorbent donc les particules de charges opposées. De ce fait, les cations métalliques peuvent se fixer à la surface des particules d'argile par échange de protons  $H^+$ , entraînant une baisse de leur disponibilité.

**La matière organique** joue aussi un rôle majeur dans la répartition des métaux entre elle et la solution du sol et par conséquent dans le contrôle de la disponibilité des métaux. Les composés organiques du sol ont en général une grande affinité pour les métaux du fait de la présence des groupements carboxyliques, phénoliques, alcooliques ou de ligands (Alloway 1995). La présence d'acides humiques agit également comme un facteur important de rétention des métaux du sol (Mühlbachova *et al.* 2004).

**La texture et la structure du sol** sont des facteurs intervenant dans la mobilité des métaux. Dans un sol structuré, la vitesse de l'eau et des composés solubles est plus grande que dans une matrice constituée de micropores. Le transport par les colloïdes du sol (particules d'argile, matière organique soluble, biomasse) peut augmenter la mobilité des métaux associés à ces solides (Mills *et al.* 1991).

**Les pratiques culturales** peuvent influencer la mobilité des métaux en modifiant les propriétés du sol et les conditions physico-chimiques, à la suite par exemple de l'apport de matière organique (boues chaulées ou non, composts, déjections animales, déchets divers) (Lavado *et al.* 2001). La nature et le mode d'application des fertilisants, la rotation des cultures et le labour jouent aussi un rôle important.

Plusieurs facteurs sont utilisés en pédologie pour décrire les transferts de métaux dans le sol dont le facteur de rétention (**Rf**) et le coefficient de distribution (**Kd**). Rf est le rapport entre la vitesse de diffusion effective et la vitesse de diffusion apparente des éléments. Il est lié à la teneur en matière organique, à la CEC, à la somme des bases échangeables et à la teneur en Ca échangeable (Roehl et Czurda 1998). Le Kd, rapport de la concentration de l'élément adsorbé sur la phase solide à la concentration du même élément dans la phase soluble, est variable selon les éléments métalliques :  $Kd(Pb) > Kd(Cu) > Kd(Cd)$  (Morera *et al.* 2001).

#### 1.4. Contamination des sols par le Cr, le Hg et le Pb

En France sur les 3727 sites contaminés recensés en 2005 par le BRGM, 17% contenaient du Pb, 14% du Cr et 6% du Hg. Les flux d'éléments traces contaminant les sols français étaient estimés en 1994 à 8300 t pour le Pb et 3,6 t pour Hg (Bourrelrier et Berthelin 1998). Bien qu'ils

ne soient pas fréquemment concernés par ces métaux, les sols agricoles peuvent les accumuler suite à une pollution d'origine industrielle. Tel est le cas du sol agricole que nous avons étudié.

#### 1.4.1. Cas du chrome

Le chrome est un métal de transition, le 7<sup>ème</sup> élément le plus abondant de la terre et le 21<sup>ème</sup> de la croûte terrestre qui, sous forme trivalente, est un élément trace essentiel pour les humains et les animaux car impliqué dans le métabolisme des glucides (Alloway 1995). En revanche, le Cr sous forme hexavalente est classé par l'IARC (Agence Internationale de Recherche sur le Cancer) comme cancérigène certain. Les voies de contamination classiques sont l'ingestion d'eau ou d'éléments contaminés et l'inhalation. Les apports quotidiens en Cr doivent être compris entre 50 et 200 µg/j selon l'organisation mondiale de la santé (WHO/FAO/IAEA 1996).

Les teneurs en Cr dans l'environnement varient de 10 à 50 mg/kg pour les sols, jusqu'à 125000 mg/kg pour les sols ultramafiques, de 0,1 à 117 µg/L pour les eaux douces et de  $5 \cdot 10^{-6}$  à  $1,2 \cdot 10^{-3}$  µg/m<sup>3</sup> dans l'air (Adriano 1986).

Le chrome est le plus souvent extrait de la chromite, minéral de type oxyde mixte : FeCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Deneux-Mustin *et al.* 2003). La production mondiale de Cr est de l'ordre de 10<sup>7</sup> t/an, dont 60 à 70 % sont utilisées dans les alliages (notamment pour l'acier inoxydable), et 15% dans les procédés industriels, principalement la tannerie du cuir, la production de pigments, les conservateurs du bois et l'électrolyse (Alloway 1995; Barnhart 1997). Le Cr est présent en tant qu'impureté dans les engrais potassiques et phosphorés avec des teneurs comprises entre 71 et 241 mg/kg selon l'origine des minerais (Al-Shawi et Dahl 1999).

#### **Spéciation dans le sol**

Selon le pH et le potentiel redox du sol, le Cr peut être sous forme anionique ou cationique, sous forme trivalente (Cr<sup>3+</sup> et CrO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ou hexavalente (Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup> et CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). La forme prédominante dans les sols est CrIII, le CrVI étant présent dans les milieux fortement pollués en Cr et dans les eaux de surface ou souterraines (Deneux-Mustin *et al.* 2003).

Dans un sol neutre alluvial contaminé par du CrIII, la plupart du Cr est lié aux oxydes de Fe ou Mn et à la matière organique et seule une faible proportion est sous forme échangeable (Bartlett 1991). Le CrIII est moins mobile que le CrVI et est précipité en tant que Cr(OH)<sub>3</sub> ou Fe<sub>x</sub>Cr<sub>(1-x)</sub>(OH)<sub>3</sub> en conditions alcalines ou légèrement acides dans le sol, ce qui conduit à son immobilité (Wittbrodt et Palmer 1995). Certaines formes de CrIII peuvent être oxydées en CrVI plus soluble par des oxydes de Mn (III ou IV) ou en présence d'un excès d'O<sub>2</sub> (Cervantes *et al.* 2001).

Le CrVI existe principalement sous forme d'anions, et n'est pas stable thermodynamiquement dans les sols exceptés dans les environnements alcalins et oxydés : il est facilement réduit en CrIII en présence de matière organique, de FeII aqueux, de composés soufrés, ou lorsque le taux d'humidité du sol est élevé (Bolan *et al.* 2003; Fendorf *et al.* 2004). Les ions chromates ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCrO}_4^-$ ) et dichromate ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) sont faiblement adsorbés sur le sol dans des conditions alcalines à légèrement acides, induisant une forte mobilité de ces ions dans les horizons de surface (Wittbrodt et Palmer 1995). Les chromates peuvent être adsorbés à pH 2-7 sur des surfaces minérales chargées positivement (notamment les oxydes de Fe et Al) mais en présence d'ions compétitifs pour ces sites d'adsorption (sulfates, silicates, carbonates), la mobilité des ions chromates peut augmenter (Zachara *et al.* 1987).

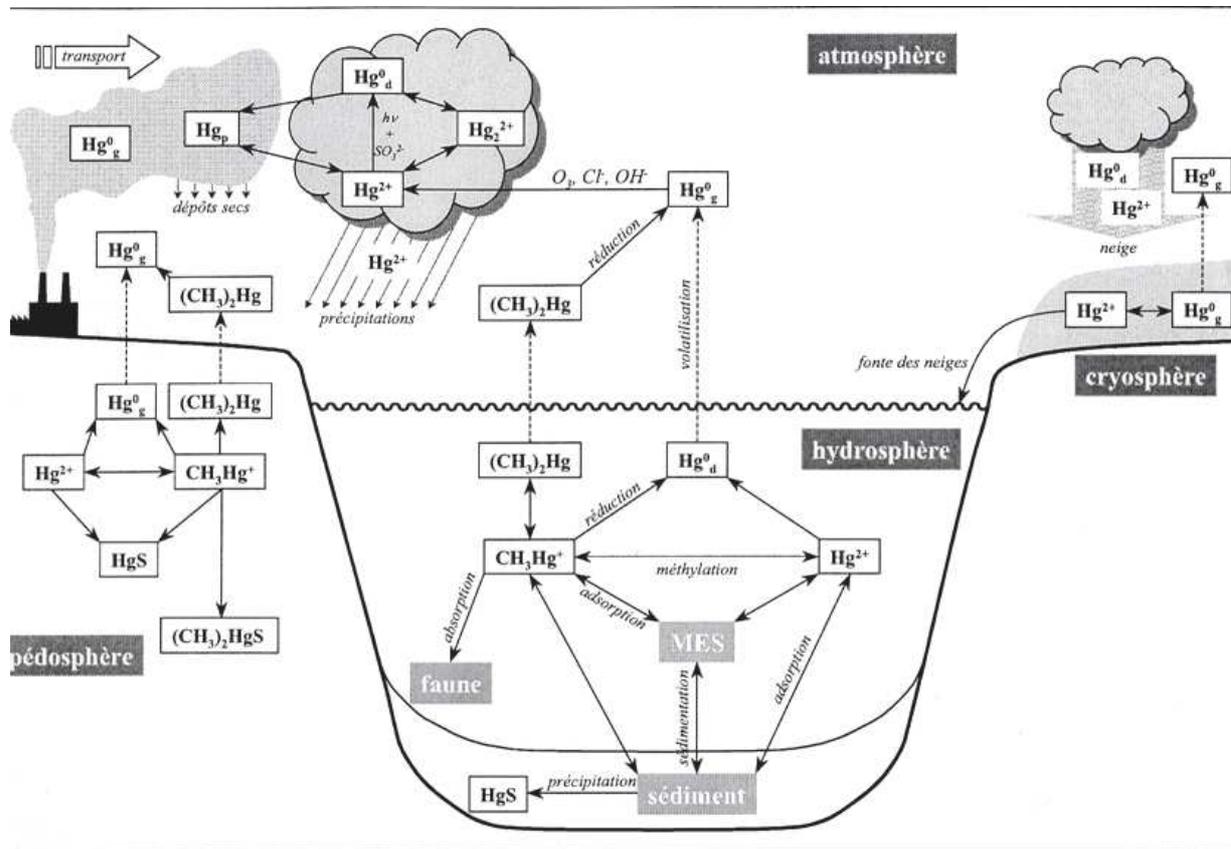
#### 1.4.2. Cas du mercure

Le mercure est un métal utilisé depuis 2500 ans, ubiquiste et pouvant être relargué dans l'atmosphère et être échangé dans les systèmes édaphiques et aqueux selon les processus suivants : les éruptions volcaniques et autres activités géothermales, l'érosion des sols, la volatilisation de Hg de la croûte terrestre en surface (Alloway 1995). Le mercure peut affecter la santé humaine par inhalation et contact cutané ou par contamination de la chaîne alimentaire (Bourelle et Berthelin 1998).

Le mercure élémentaire et les sels mercuriques sont peu disponibles dans l'environnement contrairement au méthylmercure qui représente le risque majeur de contamination de la chaîne alimentaire. La consommation de poissons contaminés est une des sources principales d'apport de mercure à l'homme (en moyenne  $0,19 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) (Ricoux et Gasztowtt 2005). En 2000, la production mondiale de mercure était estimée à 640000 t et son relargage dans l'environnement à 6000 t/an (Han *et al.* 2003). Les activités anthropiques qui contribuent à la dispersion de Hg sont : 1) la combustion d'hydrocarbures, de charbon, de déchets ménagers, 2) les procédés à haute température (fonderie, cimenteries, production de chaux), 3) les industries métallurgiques, extractives (or, mercure), l'industrie chimique (peintures, production de composés chlorés (eau de javel), piles/batteries, thermomètres, réactifs et catalyseurs dans divers procédés) et 4) des sources diverses (pesticides, fertilisants et engrais) (Hissler 2003).

Le mercure entre dans l'environnement sous forme liquide en tant que  $\text{Hg}^0$ , ou sous forme ionique  $\text{HgII}$  liée à la matière particulaire issue de la combustion de charbon, de déchets ou d'activités volcaniques, ou sous forme de complexes issus d'effluents industriels (**figure 1.2**).

La concentration en mercure dans les sols varie de 0,01 à 0,5 mg/kg (Alloway 1995), cette teneur étant en majorité dépendante de la concentration de l'élément dans l'atmosphère (Lindqvist *et al.* 1991).

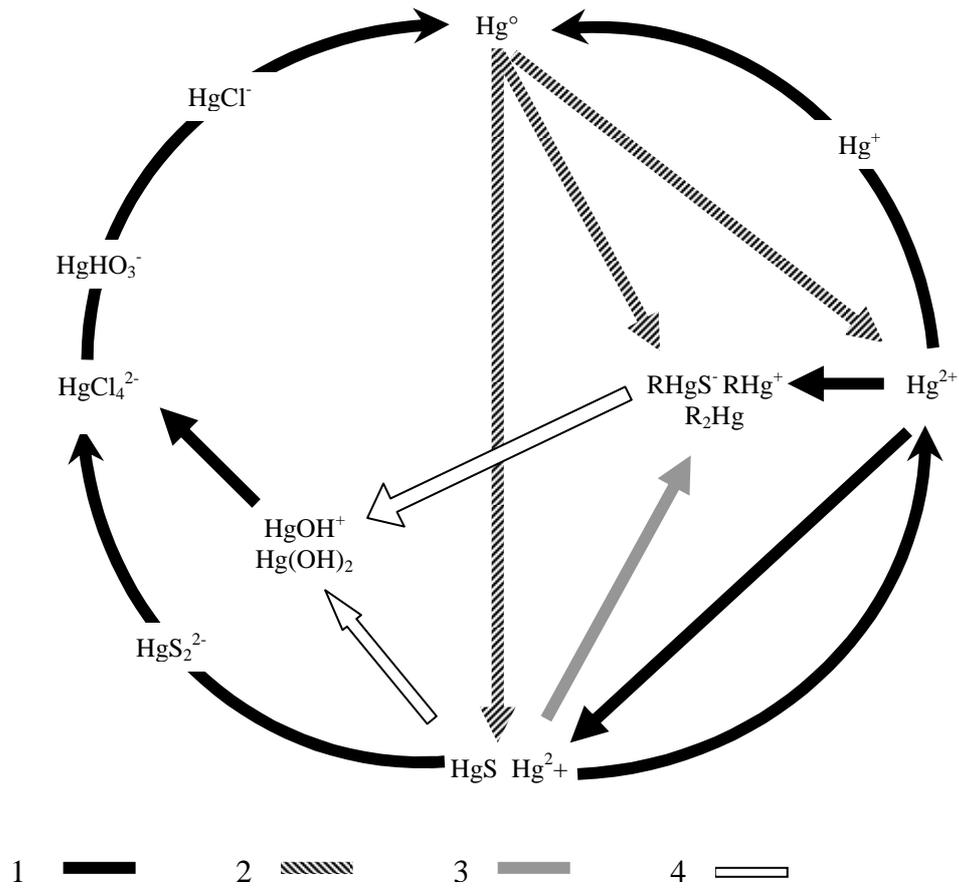


**Figure 1.2 :** Cycle biogéochimique et spéciation du mercure en milieu continental (d'après (Stein *et al.* 1996).

### Spéciation dans le sol

Le mercure dans les sols est rapidement fixé par les carbonates, les phosphates, les oxydes de Al, Fe et Mn et surtout par la matière organique, notamment les substances humiques dans les couches supérieures du sol (Andersson *et al.* 1990). En conditions anoxiques et en présence de fortes concentrations en matière organique, la formation de méthylmercure est facilitée (Andersson *et al.* 1990).

Le mercure peut être présent sous plusieurs formes : HgS, HgII, méthyl-Hg, Hg<sup>0</sup> (**figure 1.3**). Hg<sup>0</sup> et HgII sont les états d'oxydation les plus courants dans le sol. Contrairement aux autres métaux, la quantité de Hg mobilisée diminue pour un pH <3 et un pH >12, du fait du pouvoir tampon élevé des acides humiques (Yin *et al.* 1996).



**Figure 1.3 :** Espèces ioniques et transformation des composés mercuriques dans le sol ; (1) réduction, (2) oxydation, (3) formation des composés organiques, (4) hydratation, R : CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub> ou C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (Kabata-Pendias et Pendias 1992).

#### 1.4.3. Cas du plomb

Le plomb est présent dans différents minerais dont le plus exploité est la galène (PbS). Il est utilisé et rejeté sous différentes formes : Pb métallique (composants de batteries, munitions, soudure Pb-Sn), PbO (batteries, fumées d'incinération, fonderies), autres (peintures, additifs pour carburants, aciérie, pesticides) (Ruby *et al.* 1999). Le Pb, principalement relargué au cours de l'incinération de combustibles fossiles et de déchets, peut se redéposer sur le sol. Les retombées atmosphériques contribuent ainsi à 68% de l'enrichissement moyen annuel en Pb des sols dont la concentration moyenne dans les sols agricoles est de 64,8 mg/kg de sol (Miquel 2001).

Le Pb peut également être apporté aux sols agricoles par épandage de boues. Celles destinées au recyclage agricole dans le Haut-Rhin contenaient en moyenne 79 mg de Pb par kg de matière sèche (MS) en 1998, ce qui est largement inférieur aux valeurs limites fixées à 800 mg de Pb par kg de MS (MRA68 1999).

Les voies d'exposition au Pb sont principalement l'ingestion d'eau et d'aliments contaminés, notamment les mollusques, les abats, certains fruits et légumes, les champignons et le vin (Miquel 2001).

### Spéciation dans le sol

Une fois dans l'environnement, le Pb est principalement lié à la matière organique, aux oxydes de Fe et Mn et aux argiles (Chlopecka et Adriano 1997; Dong *et al.* 2000).

Les valences principales de Pb dans le sol sont II et IV et les ions PbII et Pb(OH)<sup>+</sup> prédominent dans la solution de sol (Ruby *et al.* 1999). Le Pb est très peu disponible dans le sol, la concentration des formes solubles étant en moyenne de 10<sup>-8,5</sup> M et les fractions échangeables et liées aux carbonates étant généralement inférieures à 3,5% de la teneur totale en Pb (Adriano 1986).

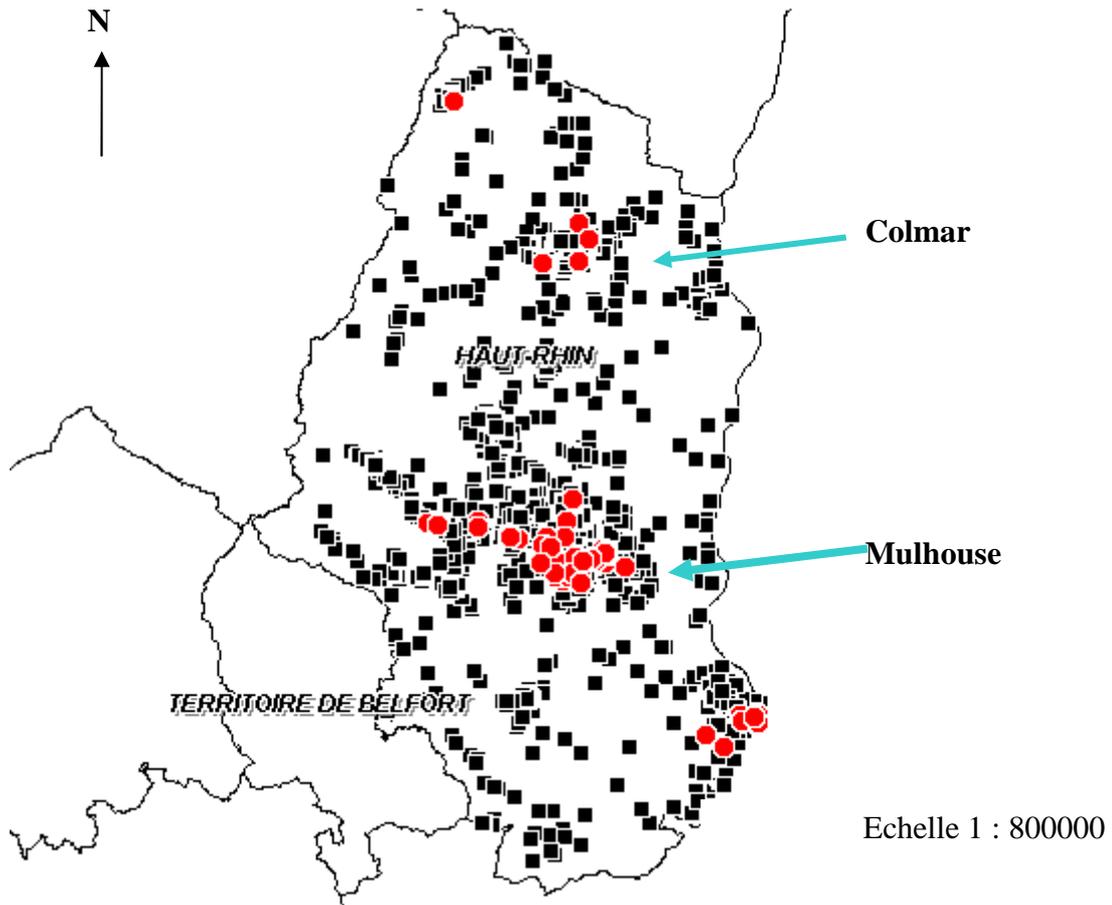
Le pH et la concentration en phosphates sont des paramètres importants régissant la mobilité du Pb (Sauve *et al.* 1997). Il a été montré que l'adsorption du Pb dans le sol augmente quand le pH augmente et que des hydroxydes métalliques peuvent se former, tel que Pb(OH)<sub>2</sub> (Martinez-Villegas *et al.* 2004; Pierangeli *et al.* 2001). En présence de phosphates, le Pb précipite sous forme d'hydroxyapatite de plomb [Pb<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>] ou floccule en chloropyromorphite [Pb<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>Cl] relativement insoluble. Ce dernier complexe peut être déstabilisé par la présence de matière organique dissoute et suite à des variations de pH (Lang et Kaupenjohann 2001).

## 1.5. Les métaux dans les sols alsaciens

L'Alsace, du fait de son passé industriel important, est la 4<sup>ème</sup> région française en terme de nombre de sites contaminés. La base de données BASOL (Base de données sur les sites et sols pollués ou potentiellement pollués) recensait en 2004, 240 sites et sols potentiellement pollués en Alsace (118 dans le Haut-Rhin et 122 dans le Bas-Rhin) (Ministère de l'écologie et du développement durable 2004) (**figure 1.4**).

Certains sites sont connus pour leurs pollutions historiques : la concession pétrolière de Pechelbronn, le bassin potassique, les dépôts de l'industrie chimique du sud du Haut-Rhin, les dépôts de résidus de lindane et le secteur industriel du travail des métaux. Le bassin de la Thur dans la partie supérieure du bassin de l'Ill est historiquement contaminé par du mercure relargué d'un site de production de chlore et de soude à Vieux-Thann (Hissler 2003). La production de chlore par électrolyse utilise encore des électrodes au mercure, dont une partie est perdue par volatilisation due aux fortes températures impliquées dans le processus (Calasans et Malm 1997).





**Figure 1.4 :** Répartition des sites recensés dans BASIAS (Anciens sites industriels et activités de service) (■) et BASOL (●) pour le Haut-Rhin (Ministère de l'écologie et du développement durable 2004).

**Tableau I.5 :** Teneurs moyennes en métaux dans les sols agricoles (mg/kg de sol sec). (1) (Baize 1997) ; (2) (MRA68 1999).

Elément	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Horizons							
Sols français (1)	0,05-0,45	10-90	2-20	0,02-0,2	2-60	9-50	10-100
Sols alsaciens (2)	0,25-0,40	30-60	15-25	<0,15	20-40	20-40	45-90
Sols haut-rhinois (2)	0,26	41,1	21,1	0,13	30,2	29,4	64,8

Les sites contaminés en Alsace en Cr, Hg et Pb sont de diverses natures : dépôts de scories (Pb), sites industriels de circuits imprimés (Cr), métallurgie (Cr), raffinerie de pétrole (Pb), boues de tannerie (Cr), fonderies et émailleries (Cr, Pb), fabriques de thermomètres (Hg), anciennes décharges d'ordures ménagères (Cr), industries textiles (Pb, Cr), usines de créosotage (Cr, Pb), stockage de déchets de fabrication d'oxyde de titane (Hg), production de chlore par électrolyse (Hg), orfèvrerie (Cr).

La base de données BASOL a estimé que 87,5% des sites alsaciens contaminés par des métaux pouvaient avoir un impact sur la pollution de la nappe rhénane (Ministère de l'écologie et du développement durable 2004). Peu d'études sont encore disponibles sur les teneurs en métaux des sols agricoles alsaciens bien que des valeurs moyennes aient été estimées (**tableau I.5**). Les sols agricoles du Haut-Rhin présentent des valeurs inférieures à celles de la norme pour le Cr, Hg et Pb dont les teneurs les plus élevées concernent l'horizon 0-20 cm (ADEME 1998). Des analyses effectuées dans la vallée de la Thur ont toutefois révélé des concentrations en Hg variant de 108 à 639 mg/kg de sédiments et de 27 à 406 mg/kg de sol (Remy *et al.* 2003). Par ailleurs, bien que les données ne soient pas publiées, plusieurs zones agricoles, le plus souvent au débouché de vallées anciennement industrielles perpendiculaires à la plaine du Rhin, ont progressivement accumulé d'autres métaux en plus du mercure tels que le chrome et le plomb.

**Tableau I.6 :** Comparaison des méthodes de dépollution physico-chimiques et biologiques pour la remédiation de sols pollués (Khan *et al.* 2004; Mulligan *et al.* 2001).

Méthode	Type de polluant	Principe	Avantages/ inconvénients	Coût (€/t)
Confinement/ encapsulation	Tout type	<b>Traitement <i>ex situ</i></b> Confinement des sols comme déchets ultimes contaminés, par des barrières étanches (argile, textiles synthétiques)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite une surveillance</li> <li>• Utilisé pour les sols hautement pollués</li> </ul> Risque de dégradation des couches imperméables et relargage des polluants	10 à 220
Désorption thermique	Organiques (HAP, PCB, pesticides)/ inorganique (mercure)	<b>Traitement sur site et <i>ex situ</i></b> Chauffage de la terre à 100-600°C pour vaporiser les contaminants et traitement des efflux	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A basse température, n'altère pas la teneur en matière organique du sol</li> <li>• Détruit la flore et faune du sol</li> </ul> Remédiation efficace >99% et indépendante de la concentration en polluants	40 à 250
Lavage du sol (soil washing)	Organiques (COV, HAP, pesticides) /inorganiques (métaux)	<b>Traitement sur site ou <i>ex situ</i></b> Excavation et lavage de la partie fine du sol à l'aide de fluides (eau, solvants) pour désorber les contaminants	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite d'avoir plusieurs solvants en cas de polycontamination</li> <li>• Dépend de la teneur en argile et limon</li> </ul> Traitement des eaux de lavage	130
Soil flushing	Organiques/ inorganiques	<b>Traitement <i>in situ</i></b> Injection ou infiltration d'eau additionnée ou non de solvants ou de surfactants et récupération des eaux injectées	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Traitement des eaux de récupération et des COV</li> <li>• Ne nécessite pas d'excavation</li> <li>• Dépend de la géologie du terrain et notamment de la perméabilité et de la nature du sol</li> </ul> Traitement de longue durée	20 à 190
Solidification/ stabilisation	Organiques/ inorganiques	<b>Traitement <i>in situ</i> et <i>ex situ</i></b> Immobilisation ou réduction de la mobilité des polluants par des moyens chimiques ou physiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La vitrification et autres procédés <i>in situ</i> sont limités par la profondeur de la pollution</li> <li>• Nécessite une surveillance à long terme</li> </ul> Augmentation du volume de déchets à confiner	60 à 250

## 2. Les techniques de dépollution du sol

### 2.1. Méthodes physico-chimiques

La majorité des sites contaminés par des métaux en France sont traités par stabilisation et confinement *in situ* ou excavation et stockage. Paff et Bosilovich (1995) ont montré que plus de 70% des sites contaminés par le Pb aux États-Unis étaient traités par immobilisation des contaminants, en général par stabilisation, et que moins de 10% étaient traités par extraction du métal. Le coût de ces méthodes de remédiation varie selon que le traitement est réalisé *in situ* (traitement du sol sans excavation), sur site (excavation du sol et traitement sur place) ou *ex situ* (excavation et transport du sol contaminé vers une unité de traitement). La plupart des techniques physico-chimiques sont onéreuses et altèrent significativement la qualité agronomique des sols contrairement aux méthodes biologiques (**tableau I.6**) (Alkorta et Garbisu 2001; Lear *et al.* 2007; Reed *et al.* 1996).

### 2.2. Méthodes biologiques

#### 2.2.1. Bioremédiation

Le terme de bioremédiation est utilisé pour décrire les processus de dégradation ou d'élimination des contaminants de l'environnement par des microorganismes (Glazer et Nikaido 1995). Cette méthode, peu coûteuse, peut être appliquée *in situ*, sans excavation de la terre ni dommages au sol. Concernant la bioremédiation de sites contaminés, différentes méthodes sont applicables :

- **L'atténuation naturelle**, forme de bioremédiation la plus simple puisqu'elle consiste uniquement en un suivi analytique de l'abattement de la pollution. Cette technique part du principe que la microflore indigène d'un site pollué a su s'adapter à la pollution considérée et peut utiliser les polluants comme nutriments. La population bactérienne capable d'utiliser ces polluants prolifère et peut alors devenir dominante (Mulligan et Yong 2004). Cette technique est néanmoins appliquée à un nombre réduit de sites en raison du temps de dépollution qui peut parfois atteindre plusieurs dizaines d'années et de la surveillance permanente qui s'impose (Heitzer et Sayler 1993) ;

- **La biostimulation** consiste à accroître l'activité de la microflore indigène, notamment en terme de croissance et de dégradation, par apport de nutriments (carbonés comme source d'énergie, minéraux) et/ou d'accepteurs finaux d'électrons (oxygène, nitrate, sulfate) pour pallier la pauvreté en nutriments du sol disponibles pour les microorganismes.

Tableau I.6 (suite)

Méthode	Type de polluant	Principe	Avantages/ inconvénients	Coût (€/t)
Venting/ bioventing	Organiques (COV)	<b>Traitement <i>in situ</i></b> Injection d'un flux d'O <sub>2</sub> (ou de nutriments = bioventing) dans le sol pour augmenter la désorption des COV et accélérer leur biodégradation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plus ou moins efficace selon la géologie et l'hydrogéologie du terrain</li> <li>• Traitement de l'air extrait</li> <li>• Traitement rapide ( 2 mois à 2 ans)</li> <li>• Efficace sur les COV, BTEX</li> </ul>	15 à 70
Biopiles	Organiques	<b>Traitement sur site ou <i>ex situ</i></b> Excavation de la terre et traitement en andains avec aération, apport de nutriments et contrôle de la T° et du pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Récupération des lixiviats et des COV</li> <li>• Traitement rapide (6 mois à 2 ans)</li> <li>• Efficacité limitée à 95% en particulier avec HAP récalcitrants/élevés</li> <li>• Inhibition possible si présence de métaux toxiques</li> <li>• Nécessite une grande surface (mais moins que le landfarming)</li> </ul>	80 à 175
Bioréacteurs	Organiques	<b>Traitement <i>ex situ</i></b> Mélange du sol avec nutriments et inoculum bactérien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conditions contrôlées</li> <li>• Traitement de gaz et des lixiviats produits</li> <li>• Efficace pour les molécules récalcitrantes</li> <li>• Faible durée du traitement (1 à 6 mois)</li> <li>• Nécessite l'installation d'un équipement spécial et coûteux (de 0,1 à 1,52 millions d'euros)</li> </ul>	70 à 300
Landfarming	Organiques (BTEX, HAP)	<b>Traitement sur site ou <i>ex situ</i></b> Utilisation de la bioremédiation sur les terres excavées et épanchées en couche fine (1,5 cm), addition possible d'eau et de nutriments	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite une grande surface</li> <li>• Efficace pour les hydrocarbures légers</li> <li>• Conditions contrôlées (pH, O<sub>2</sub>, nutriments, humidité) pour dégradation efficace</li> <li>• Pas de récupération des COV</li> </ul>	20 à 45
Phytoremédiation	Organiques (HAP, PCB, pesticides, /inorganiques	<b>Traitement <i>in situ</i></b> Utilisation de végétaux pour biosorber, stabiliser ou accumuler des métaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conserve les propriétés agronomiques du sol, méthode non-destructive</li> <li>• Méthode longue (plusieurs années)</li> <li>• Traitement des déchets</li> </ul>	10 à 20

La gestion « à l’aveugle » de la microflore caractérise cette technique puisque les microorganismes qui bénéficient de la « stimulation » ne sont pas forcément ceux impliqués dans le traitement du (des) contaminant(s) (El Fantroussi et Agathos 2005);

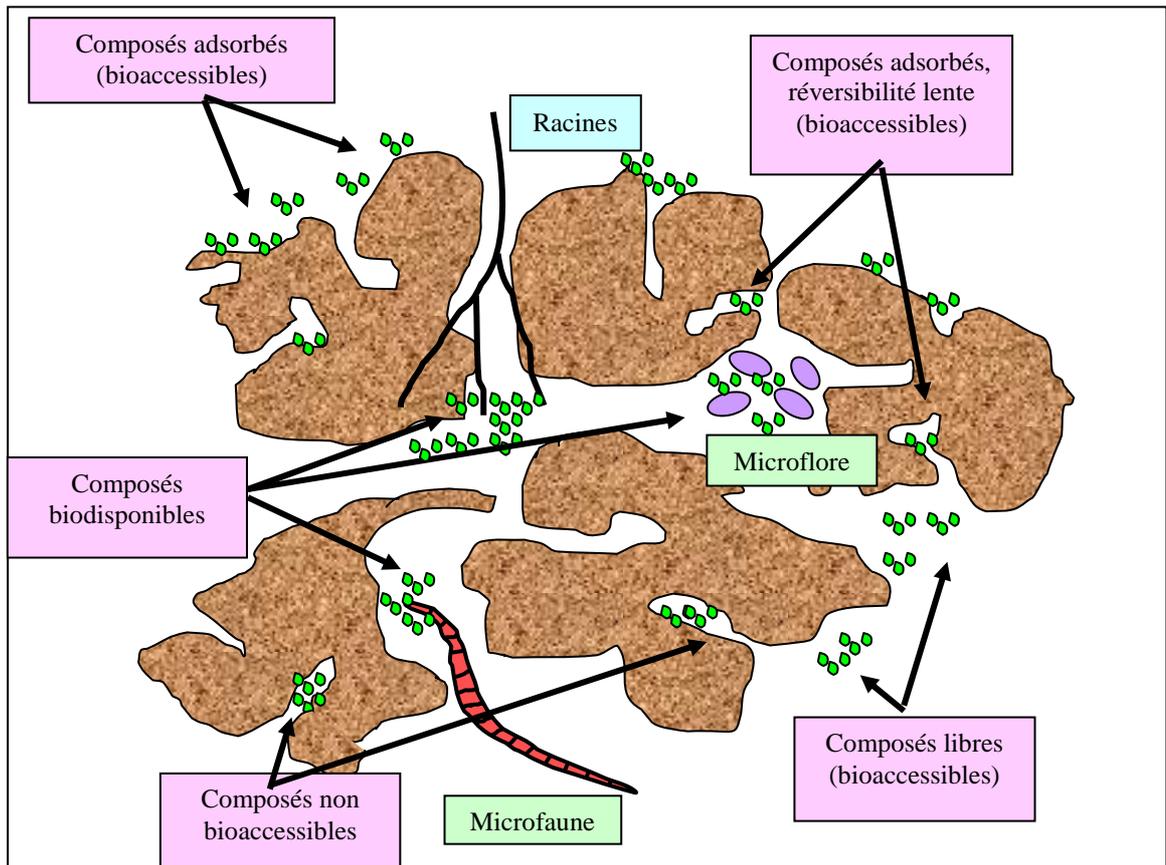
- **La bioaugmentation**, caractérisée par l’ajout de microorganismes d’intérêt dans le sol, a pour but de stimuler la dégradation des polluants organiques et d’agir sur la spéciation des polluants inorganiques. Les microorganismes employés peuvent être issus de sélections réalisées à partir d’échantillons environnementaux (sols, sédiments, boues, etc.). Ils sont ensuite cultivés en masse et inoculés dans leur environnement d’origine ou dans un autre environnement. Des microorganismes génétiquement modifiés peuvent être utilisés à ce titre mais leur introduction dans l’environnement doit faire l’objet de contrôles poussés (Sayler et Ripp 2000).

## 2.2.2. Interactions microorganismes/ métaux

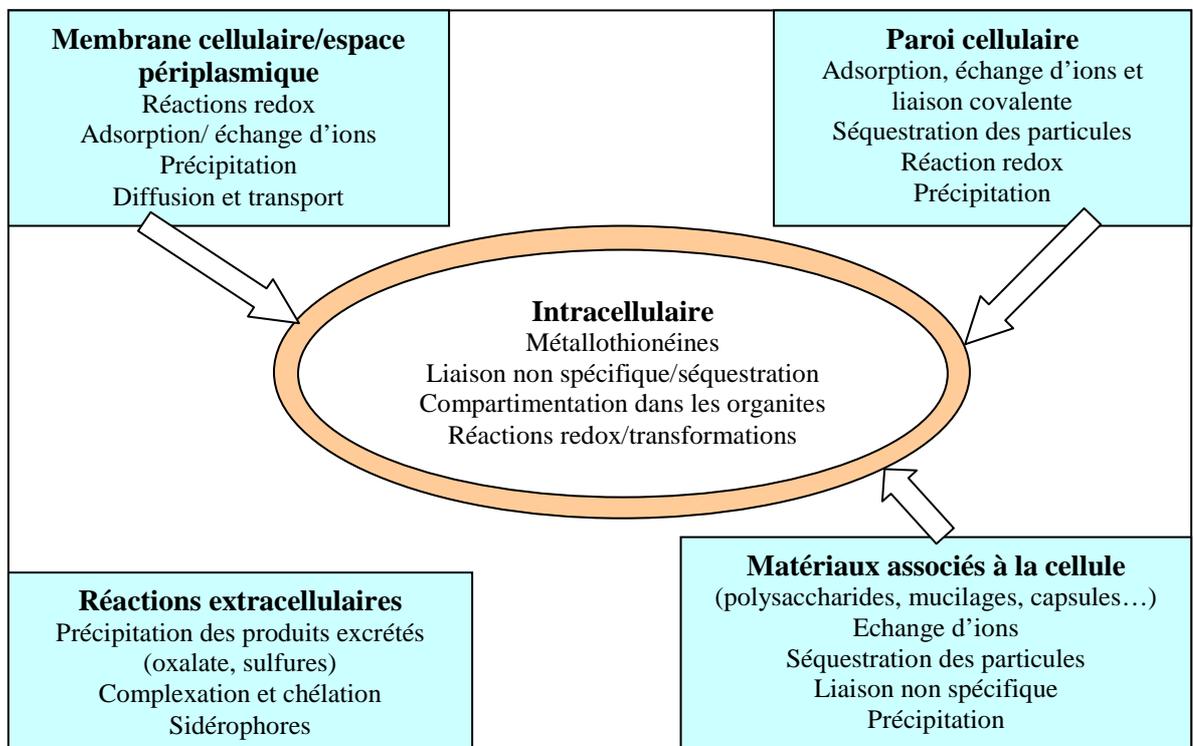
### 2.2.2.1. Effet des métaux sur les microorganismes

Suite à un amendement en boues de station d’épuration, la biomasse et l’activité microbienne dans les sols contaminés par les métaux sont souvent inférieures à celles d’un sol non contaminé, du fait de l’impact négatif des métaux toxiques sur l’activité et la structure de la communauté microbienne (Chaussod 1996). De fortes concentrations en métaux (Cd, Cu, Pb, Zn, etc.) peuvent ralentir voire inhiber la minéralisation de l’azote (ammonification, nitrification), la fixation symbiotique de l’azote, la dénitrification et d’autres activités enzymatiques (glucosidase, catalase, lipase, phosphatase, déshydrogénase) (Berthelin et Leyval 2000; Diaz-Ravina *et al.* 1994). La modification des fonctions microbiennes perturbe ainsi le bon fonctionnement des cycles biogéochimiques dont les répercussions sont, par exemple, une tendance à l’accumulation de la matière organique dans les milieux fortement contaminés (Dahlin et Witter 1998; Shi *et al.* 2002). L’exposition à long terme à un polluant peut cependant stimuler le transfert de gènes au sein de la communauté bactérienne et peut favoriser l’émergence de populations résistantes (Berthelin et Leyval 2000).

Les effets des métaux sur les microorganismes dépendent de leur concentration dans les fractions échangeables et dans la solution du sol, dites respectivement bioaccessibles et biodisponibles (voir paragraphe 1.1.2) (**figure 1.5**).



**Figure 1.5 :** Schéma représentant les fractions bioaccessibles et biodisponibles d'un contaminant dans un sol (d'après Semple *et al.*, 2004).



**Figure 1.6 :** Processus microbiens contribuant aux interactions et à la détoxification des métaux lourds (adapté de Gadd et White, 1993).

Les métaux de la fraction biodisponible peuvent influencer négativement sur les microorganismes. Leurs effets peuvent être atténués ou complètement disparaître si les métaux sont adsorbés sur des particules argileuses ou organiques, complexés, ou bien précipités à un pH alcalin (Chuan *et al.* 1996).

La sensibilité de certains microorganismes à la toxicité des métaux a pu être exploitée dans la détection de la pollution en les transformant en biocapteurs. C'est un des seuls moyens pour quantifier la fraction métallique réellement biodisponible dans le sol. Par exemple, des biocapteurs réalisés avec *Ralstonia metallidurans* AE 2440 (anciennement *Alcaligenes eutrophus*) sensible au CrVI et AE 2448 sensible au PbII ont été construits pour évaluer les teneurs en Cr et Pb dans le sol (Corbisier *et al.* 1999). Un biocapteur utilisant une construction de fusion entre le promoteur *mer* R et des gènes *lux* a également été construit pour suivre les concentrations en Hg dans le sol (Rasmussen *et al.* 2000).

### **Mécanismes de résistance des microorganismes en présence de métaux**

La réaction des microorganismes aux métaux est principalement basée sur des mécanismes de résistance et de détoxification de ces métaux. Les systèmes de résistance sont le plus souvent plasmidiques, assez spécifiques et confèrent en général une résistance à plusieurs métaux par des systèmes d'efflux (Ji et Silver 1995).

Il existe cinq mécanismes de résistance microbiens ; les microorganismes peuvent en posséder un ou une combinaison de plusieurs (Bruins *et al.* 2000) (**figure 1.6**) :

- Exclusion du métal de façon active ou passive ;
- Séquestration intracellulaire par fixation sur des protéines riches en cystéine ;
- Séquestration extracellulaire par bioprécipitation ou sécrétion de métabolites ;
- Détoxification enzymatique ;
- Réduction adaptative de la sensibilité des cellules cibles aux métaux.

Le déclenchement des mécanismes de résistance va jouer sur la mobilité et l'immobilité des métaux dans le sol.

### **Mobilisation des métaux**

Elle se manifeste sous différentes formes (Gadd 2004) :

- **La lixiviation hétérotrophe** : les microorganismes chimioorganotrophes acidifient l'environnement par efflux de H<sup>+</sup> dû aux pompes H<sup>+</sup>-ATPases ou par accumulation de CO<sub>2</sub> dû à la respiration. Cela peut également être le fait du relargage de sidérophores ou d'acides organiques (citrique, oxalique). Le sidérophore alcaligine E produit *par R. metallidurans* CH34 permet notamment d'augmenter la disponibilité de Cd, Pb et Zn par complexation (Diels *et al.* 1999) ;



- **La lixiviation autotrophe** : les bactéries chimiolithotrophes acidophiles oxydent le FeII en FeIII et les composés soufrés en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'acidification du milieu mobilise les métaux ;
- **La biométhylation** : cette réaction est possible pour Ag, Hg, Pb, Se, Sn, Te. Les composés méthylés sont biologiquement plus mobiles que la forme élémentaire ;
- **Les réactions d'oxydoréduction** : la réduction des oxyhydroxydes de Fe et Mn ou l'oxydation des sulfures augmente la mobilité des métaux qui leur sont associés dans le sol.
- **Les biocolloïdes** : de par leur ubiquité et leurs propriétés d'adsorption, les microorganismes peuvent jouer un rôle important dans la mobilité des polluants dans l'environnement. Par exemple, la vitesse de transport de Cd, Hg et Zn par des colloïdes biotiques (*E. coli* et *R. metallidurans* CH34) est multipliée par 4 à 6 fois par rapport aux substances dissoutes du sol (Guiné et Martins 2003).

### Immobilisation des métaux

Elle regroupe :

- **La biosorption**, réaction rapide, aspécifique, dépend des propriétés des parois microbiennes. La réactivité des parois bactériennes est essentiellement due aux groupements carboxyliques du peptidoglycane et aux groupements phosphates de l'acide téichoïque et téichuronique (Volesky et Holan 1995). Pour les champignons, la mélanine, la chitine et le chitosan seraient responsables de la plus grande partie de l'adsorption des métaux par leurs groupements phosphates et carboxylates (Volesky et Holan 1995). Les biofilms bactériens sont d'une manière générale plus résistants aux métaux du fait de la surproduction d'EPS (exopolysaccharides) qui piègent les métaux par adsorption, en particulier chez *P. aeruginosa* (Teitzel et Parsek 2003) ;
- **La bioaccumulation**, piégeage des métaux dans la cellule par des composés similaires aux métallothionéines (Howe *et al.* 1997) ou aux phytochélatines (Rauser 1995) ;
- **La précipitation** des métaux par réduction des composés métalliques par les bactéries sulfato-réductrices ou par sécrétion d'oxalate, phosphates et carbonates (Gadd 2004) ;
- **Les réactions d'oxydoréduction** : réduction des sulfates qui précipitent sous forme de sulfures métalliques ou réduction d'autres éléments (par exemple : CrVI en CrIII), ou oxydation de Fe et Mn sous forme d'oxyhydroxydes.

#### 2.2.2.2. Interaction des microorganismes avec le chrome

Contrairement à la plupart des métaux présents sous forme cationique, le Cr peut être sous la forme oxyanionique (CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) et par conséquent ne peut être fixé sur les composants anioniques des parois bactériennes.

De nombreux microorganismes possèdent des plasmides de résistance au Cr, notamment *Pseudomonas fluorescens* (Ohtake *et al.* 1987) et *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes *et al.* 1990). *Ralstonia metallidurans* CH34 est une bactérie peu sensible à la toxicité métallique, notamment au Cr, car elle possède deux méga-plasmides qui lui confèrent une résistance aux métaux suivants (Mergeay *et al.* 1985) :

- PMOL 30 : CdII, CoII, CuII, HgII, PbII, TII, ZnII.
- PMOL 28 : CoII, CrVI, HgII, NiII, ZnII.

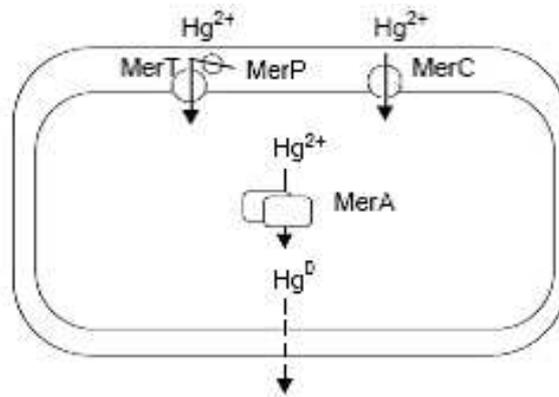
La résistance des microorganismes aux ions chromates est basée sur un système d'efflux de ces ions par une protéine antiporteur chromate/sulfate, qui exclue les ions chromates du cytoplasme par des vésicules membranaires (Nies 1999).

La réduction biologique de CrVI en CrIII est un mécanisme potentiel de détoxification, et de contrôle de la dispersion du Cr, qui peut être réalisé par des bactéries telle que *P. fluorescens* (Desjardin *et al.* 2002) ou par des champignons, *Aspergillus* et *Penicillium*, isolés sur un sol contaminé, et qui ont également montré d'excellentes capacités de biosorption du Cr sur leur paroi (Cervantes *et al.* 2001).

### 2.2.2.3. Interaction des microorganismes avec le mercure

Les sols contiennent naturellement peu de bactéries résistantes au Hg, environ 0,01% soit 0,07 % des bactéries hétérotrophes totales (Ranjard *et al.* 1997). Le contact avec le Hg permet non seulement une augmentation du nombre de bactéries résistantes mais également une augmentation de la proportion des bactéries Gram<sup>-</sup> parmi celles-ci (Ranjard *et al.* 1997). Olson *et al.* (1989) ont également montré que les bactéries Gram<sup>-</sup> étaient majoritaires dans les sols et surtout dans les sédiments pollués en Hg, en particulier celles du genre *Pseudomonas*.

La résistance au HgII est codée par un ensemble de gènes regroupés dans l'opéron *mer*, identifié chez des bactéries Gram<sup>+</sup> (*Bacillus* sp.) et Gram<sup>-</sup> (*Pseudomonas* sp., *Thiobacillus ferrooxidans*) (Osborn *et al.* 1997). Cet opéron code pour des protéines périplasmiques, dont Mer T et Mer C qui collectent HgII dans l'environnement et le transfèrent dans le cytoplasme (**figure 1.7**). L'opéron code également pour deux enzymes : l'organomercuriale lyase Mer B qui hydrolyse les composés mercuriques stables liés au carbone, et la réductase mercurique Mer A qui utilise les substrats de la première hydrolyse pour réduire HgII en Hg<sup>0</sup>. Le Hg<sup>0</sup> volatile est ensuite relargué dans l'environnement par diffusion à travers la membrane cellulaire.



**Figure 1.7** : Schéma de résistance microbienne au mercure (Nies 1999)

En conditions anaérobies, les ions  $\text{Hg}^{\text{II}}$  peuvent être méthylés principalement en composés monométhyl ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) ou diméthylmercure ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) (Barkay *et al.* 1992). Les composés méthylmercure sont plus toxiques et plus mobiles que les autres formes, et bloquent les sites d'activité enzymatique, interférant dans la synthèse protéique et empêchant l'incorporation de la thymine dans l'ADN (Misra 1992).

#### 2.2.2.4. Interaction des microorganismes avec le plomb

Les mécanismes de résistance au Pb varient en fonction du microorganisme et de la disponibilité du métal dans le sol. La résistance au  $\text{Pb}^{\text{II}}$  est portée par *zntA* chez *E. coli* et *cadA* chez *Staphylococcus aureus* (Ji et Silver 1995). Ce système est basé sur une pompe à efflux ATP dépendant. *Pseudomonas marginalis* réagit quant à lui en produisant un excès d'EPS et *Bacillus megaterium* par accumulation intracellulaire de Pb (Roane 1999).

De nombreux microorganismes sont capables d'immobiliser le  $\text{Pb}^{\text{II}}$  par biosorption sur leur paroi, notamment *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., (Fein *et al.* 1997; Leung *et al.* 2001) et quelques champignons comme *Aspergillus niger* (Dursun *et al.* 2003). *P. aeruginosa* PU21 est capable d'adsorber le Pb à raison de 110 mg/g de biomasse vivante et 70 mg/g de biomasse morte ; les cellules vivantes peuvent sécréter de l'alginate, ce qui augmente la capacité de biosorption du Pb (Chang *et al.* 1997). Inversement des microorganismes peuvent mobiliser le Pb par exsudation d'acides organiques, par exemple *Clostridium* par production d'acide acétique (Francis et Dodge 1987). Les bactéries sulfato-oxydantes peuvent également solubiliser le Pb contenu dans la galène ( $\text{PbS}_2$ ) par production d' $\text{H}_2\text{SO}_4$ , mais ce processus serait insuffisant pour traiter les sols contaminés en Pb par biolixiviation (Gomez et Bosecker 1999).

## 2.2.3. Utilité des métabolites microbiens en bioremédiation

Comme vu précédemment, la mobilité des métaux peut être augmentée dans le sol grâce à la production de métabolites microbiens tels que les biosurfactants, sidérophores et acides organiques. Leurs effets sont reportés dans le **tableau I.7**.

**Tableau I.7** : Récapitulatif des métabolites efficaces pour la mobilisation des métaux.

Microorganismes	Métabolites produits	% de métaux mobilisés	Conditions de l'étude	Références
<i>Bacillus subtilis</i>	<b>Surfactine</b> (biosurfactant)	70% Cu, 22% Zn	Lavages du sol avec de la surfactine	(Mulligan <i>et al.</i> 1999b)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>Pyoverdine</b> <b>Pyochéline</b> (sidérophores) <b>Rhamnolipides</b> (biosurfactant)	60% Cd, 40% Pb, 40% Zn	Lavage d'un sol contaminé avec des rhamnolipides	(Herman <i>et al.</i> 1995)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<b>Pyoverdine</b> <b>Pyochéline</b> <b>Viscosine</b> (biosurfactant) <b>Gluconate</b> (acide organique)	60% Zn	Inoculation de la bactérie dans un milieu gélosé avec du phosphate de zinc	(Di Simine <i>et al.</i> 1998)
<i>Ralstonia metallidurans</i>	<b>Alcaligine E</b> (siderophore)	84% Cd, 84% Pb, 84% Zn	Inoculation de la bactérie dans un réacteur avec du sol contaminé	(Diels <i>et al.</i> 1999)
<i>Aspergillus niger</i>	<b>Acides citrique, oxalique</b> <b>Sidérophores fongiques</b>	37% Cr, 91% Hg, 85% Pb	Inoculation dans un sol argileux contaminé	(Wasay <i>et al.</i> 1998)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	<b>Acides citrique, oxalique</b> <b>Sidérophores fongiques</b>	54% Co, 36% Ni	Inoculation dans de la latérite	(Valix <i>et al.</i> 2001)

## 2.2.3.1. Acides organiques et inorganiques

Certaines bactéries, comme *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *Bacillus* sp., sont capables de synthétiser des acides forts tel que l'acide hydrocyanique (HCN) (Gadd 2000). Ce métabolite peut être utilisé pour la solubilisation de métaux par biolixiviation, par exemple pour la récupération de l'or avec *Chromobacterium violaceum* (Faramarzi *et al.* 2004).

Les bactéries et champignons hétérotrophes peuvent aussi solubiliser le métal par production d'acides organiques faibles (acides oxalique, lactique, citrique, gluconique) (Gadd

2004). Les métaux sont mobilisés par déplacement des ions métalliques de la matrice par des protons et par la formation de complexes métalliques solubles. Les genres les plus efficaces sont *Aspergillus* et *Penicillium*, qui produisent de l'acide citrique et oxalique (Gadd et Poole 1999). L'acide citrique est un des acides organiques parmi les plus efficaces pour solubiliser Ni et Zn (Castro *et al.* 2000; Valix *et al.* 2001) et l'acide oxalique pour le Pb contenu dans la pyromorphite (Sayer *et al.* 1999). *A. niger* et *P. simplicissimum* sont capables de mobiliser 65% de Cu et de Sn et plus de 95% de Al, Ni, Pb et Zn à partir de déchets électroniques, par production d'acide citrique et oxalique (Brandl *et al.* 2001). Une souche de *P. fluorescens* isolée à partir d'un sol forestier peut, en présence de glucose, solubiliser du phosphate de zinc probablement par production d'acide gluconique (Di Simine *et al.* 1998).

#### 2.2.3.2. Biosurfactants

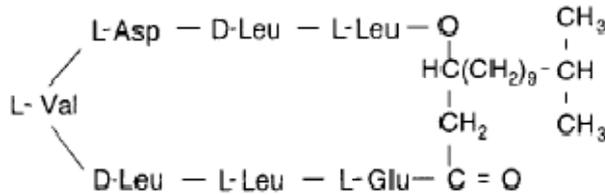
Les biosurfactants (BIOlogical SURFace ACTIVE ageNTS) sont des molécules amphiphiles, anioniques, cationiques, amphotères ou non ioniques, dont les principaux producteurs sont *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa* (Banat *et al.* 2000). Il existe différents groupes de biosurfactants, les plus étudiés étant les glycolipides et les phospholipides.

La structure des biosurfactants inclut une moitié hydrophile composée soit d'acides aminés, de peptides, d'anions, de cations, soit de polysaccharides. La partie hydrophobe est souvent constituée d'acides gras saturés, insaturés ou hydroxylés ou composée de peptides amphiphiles ou hydrophobes (Georgiou *et al.* 1992).

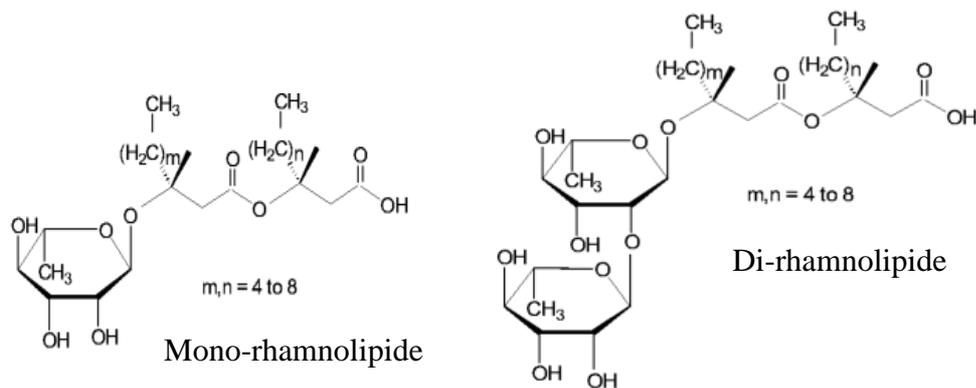
A l'instar de leurs homologues chimiques, les biosurfactants agissent en réduisant la tension de surface des molécules, c'est à dire en minimisant la force agissant sur la surface d'un liquide. Ils sont caractérisés par leur concentration micellaire critique (CMC) qui dépend de la concentration en surfactants, de leur nature et du pH. Au dessus de la CMC, des micelles et des vésicules se forment (Zhang et Miller 1992). Dans la plupart des cas, les biosurfactants ont une CMC plus faible que celle des surfactants synthétiques, et sont par conséquent plus efficaces (Christofi et Ivshina 2002; Cooper *et al.* 1981). Etant de plus biodégradables et non toxiques, cela leur confère un avantage sur l'utilisation de surfactants synthétiques (Banat 1995).

Les biosurfactants jouent un rôle essentiel pour la survie des microorganismes producteurs en facilitant le transport des nutriments et/ou les interactions entre hôte (cellules animales, microbiennes ou végétales) et microorganismes (Banat 1995; Sung-Chyr 1996). Les biosurfactants peuvent par exemple modifier les propriétés de surface des cellules bactériennes, ce qui peut améliorer la colonisation racinaire (Bar-Ness *et al.* 1988).

La surfactine produite par *Bacillus subtilis* (**figure 1.8**) possède des propriétés de surface exceptionnelles et compte parmi les biosurfactants les plus efficaces avec les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* (Desai et Banat 1997; Mulligan *et al.* 1999b). La sécrétion de rhamnolipides s'observe en phase stationnaire de croissance sous deux formes : mono-rhamnolipides ou di-rhamnolipides (**figure 1.9**) (Patel et Desai 1997). Ces composés possèdent en outre des propriétés antibiotiques, ce qui leur confère un avantage compétitif pour la colonisation du sol par rapport aux microorganismes indigènes (Christofi et Ivshina 2002).



**Figure 1.8** : Structure de la surfactine produite par *B. subtilis* (Desai et Banat 1997).



**Figure 1.9** : Structure de rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* (Soberón-Chávez *et al.* 2005).

Selon Miller (1995), l'ajout de biosurfactants augmente la désorption des métaux du sol selon deux voies : (1) la complexation de la forme métallique libre, ce qui diminue l'activité de la phase soluble du métal et favorise la désorption selon le principe de Le Châtelier\*, (2) l'accumulation des biosurfactants à l'interface solide/solution, ce qui engendre un contact direct entre le biosurfactant et le métal et permet sa mobilisation par formation de micelles. Les biosurfactants tels que la surfactine et les rhamnolipides peuvent mobiliser le Cu de la fraction organique du sol (Mulligan *et al.* 1999a). Les rhamnolipides de *P. aeruginosa* complexent préférentiellement le Cd, le Pb et le Zn plutôt que le Ca ou le Mg (Herman *et al.* 1995).

\* Etablie en 1884, la loi de Le Châtelier prévoit que, si l'on modifie les conditions imposées à un système en équilibre stable, ce dernier évolue dans le sens qui tend à le ramener dans son état initial.

### 2.2.3.3. Sidérophores

Le fer, deuxième métal le plus abondant sur terre, peut être oxydé en FeIII et être chélaté sous forme de complexes insolubles (hydroxydes ferriques) ; il est seulement présent sous forme libre à  $10^{-17}$  M dans le sol, alors que les bactéries requièrent au minimum  $10^{-6}$  M pour leur croissance (Gram 1996). Les microorganismes doivent alors employer des moyens efficaces pour récupérer le Fe dans l'environnement, tel que les sidérophores.

Les sidérophores sont des composés de faible poids moléculaire (<1500 Da), produits par les microorganismes, plantes et animaux, qui interviennent dans la séquestration et le transport de fer ferrique. Il existe différents types de sidérophores bactériens ou fongiques dont les plus courants sont les hydroxamates et les phénol-catécholates (Baakza *et al.* 2004; Barton et Hemming 1993). L'acide citrique peut également jouer le rôle de sidérophore, sa production par *Bradyrhizobium japonicum* a été montrée en conditions de stress ferrique (Guerinot *et al.* 1990).

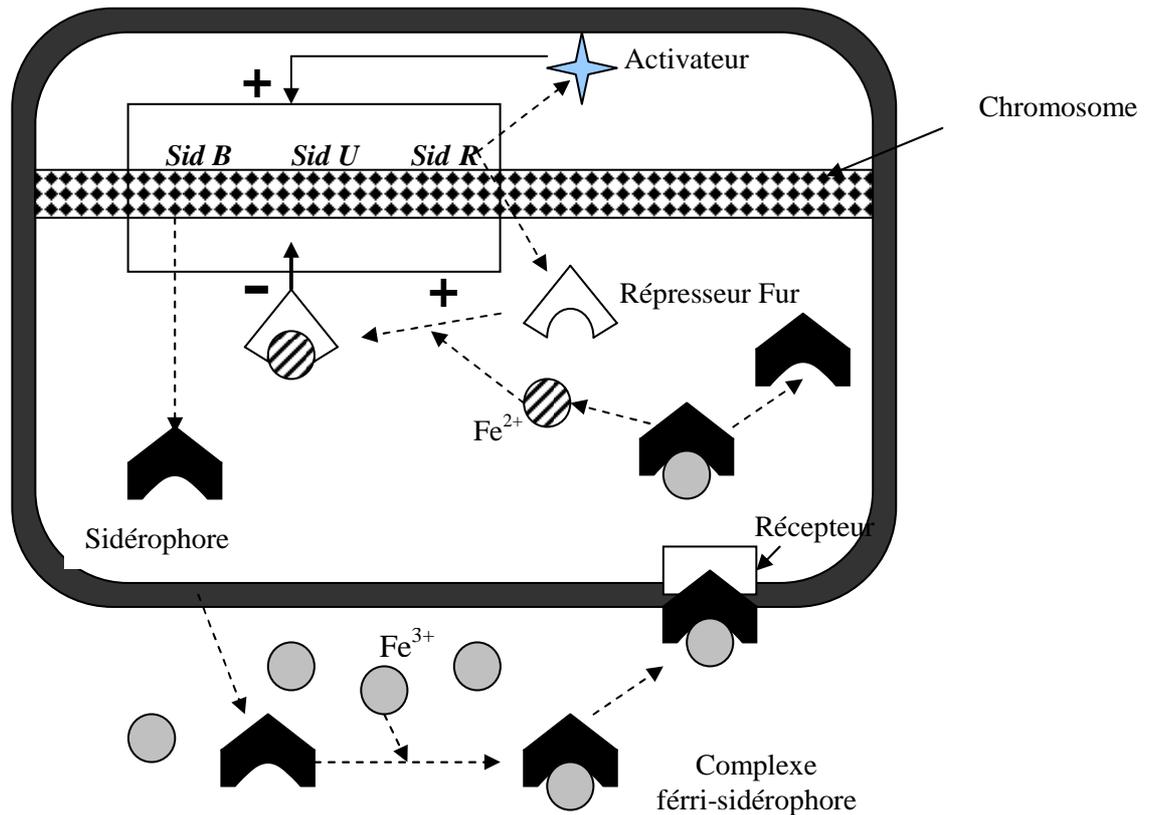
Les sidérophores complexent le FeIII avant d'être reconnus comme ferri-sidérophores par des récepteurs spécifiques (**figure 1.10**) (Guerinot 1994). Une fois dans la cellule le FeIII est réduit en FeII, ce qui le libère du sidérophore pour lequel le FeII a une moindre affinité. Le FeII présent dans la cellule se lie à une protéine Fur qui réprime la synthèse de sidérophores (O'Sullivan et O'Gara 1992). Pour maintenir l'homéostasie microbienne, le système de production des sidérophores doit être fortement régulé de façon à éviter la perte d'énergie et l'accumulation de FeII qui peut être toxique par production de radicaux OH• *via* la réaction de Fenton\* (Braun et Killmann 1999).

Les sidérophores peuvent former des complexes avec d'autres métaux mais qui sont moins stables que le complexe sidérophore-FeIII dont la constante d'affinité est en général de  $10^{30}$  (Neilands 1995).

La production et l'activité des sidérophores dans l'environnement est régulée par différents facteurs édaphiques et biotiques : la concentration et la spéciation du fer, la nature et la concentration en sources de C et N, le taux de phosphates, le pH, le taux d'aération, la présence d'éléments traces (Mn, Mo, Zn) et la température (O'Sullivan et O'Gara 1992), mais également par la composition du sol, notamment la teneur en composés argileux (Neubauer *et al.* 2000). Malgré la présence de FeIII dans les sols, des quantités significatives de sidérophores libres (quelques  $\mu\text{mol/L}$  dans la solution de sol) sont disponibles (Bossier *et al.* 1988).

---

\* Réaction de Fenton :  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}_2^+ \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$



**Figure 1.10** : Modèle de prélèvement du FeIII par les sidérophores de *Pseudomonas fluorescents*. *Sid B* : gènes de biosynthèse des sidérophores, *Sid U* : gènes de prélèvement du complexe ferri-sidérophore, *Sid R* : gène de régulation (O'Sullivan et O'Gara 1992).

Les conditions de croissance et la composition du milieu de culture sont des facteurs importants pour maximiser la production de sidérophores. Les microorganismes ont besoin d'apports d'acides aminés et de substrats carbonés dans le milieu pour synthétiser les sidérophores et les récepteurs correspondants. Les besoins en N de *P. fluorescens* augmentent lors de carences en Fe, ce qui peut être une conséquence des besoins en nutriments pour la synthèse de sidérophores (Persson *et al.* 1990). Les sidérophores sont également sensibles aux variations de pH : un pH trop faible augmente la quantité de fer dissous et donc diminue la production de sidérophores tandis qu'un pH trop élevé peut conduire à une rupture des catéchols (Budzikiewicz 1993)

### **Production de sidérophores par les *Pseudomonas fluorescents***

Les *Pseudomonas fluorescents* (PF) sont des  $\gamma$ -proteobactéries connues pour leur capacité à coloniser de nombreuses niches écologiques. La complexité et la diversité de leur système de prélèvement du fer reflètent cette adaptabilité. La majorité des PF produisent des sidérophores



appelés pyoverdines (Pvd) et pyochélines (Pch) qui sont dérivées de l'acide salicylique (Budzikiewicz 1997). La production de Pch et Pvd, qui chélatent le fer et d'autres métaux, contribue à la suppression des phytopathogènes, et offre un avantage compétitif aux microorganismes producteurs vis à vis du prélèvement d'éléments traces essentiels (Bloemberg et Lugtenberg 2001).

Les PF peuvent produire d'autres sidérophores détectables par la méthode universelle de Schwyn et Neilands (1987) : la pseudomonine, l'acide pyridine-2,6-dithiocarboxylique, la quinolobactine, la corrugatine et la nocardamine (Cornelis et Matthijs 2002).

La production de pyoverdines et de pyochélines peut être augmentée en fonction de la source de carbone utilisée, notamment le glucose, le succinate de sodium, le mannitol, le fructose et l'acide glutamique, et en fonction du ratio C/N (Abd-Allah 1998; Díaz de Villegas *et al.* 2002; Duffy et Defago 1999; Sharma et Johri 2003a). En revanche, le glycérol et le sucrose ne semblent pas avoir d'effet sur leur production (Duffy et Defago 1999).

La production de pyoverdine peut être inhibée par des métaux tels que le CuII (0,5 mM) et le CrIII (0,5 mM) ainsi que par HgII (0,02 mM) pour la production de pyoverdine et de pyochéline (Hassen *et al.* 1998; Sharma et Johri 2003a). A l'inverse, la production de pyochéline et de pyoverdine peut être stimulée par ZnII (0,5 mM), CdII (0,5 mM) et CoII (0,1 mM) (Dao *et al.* 1999; Duffy et Defago 1999; Höfte *et al.* 1993).

Plusieurs explications ont été envisagées (van der Lelie *et al.* 2000) :

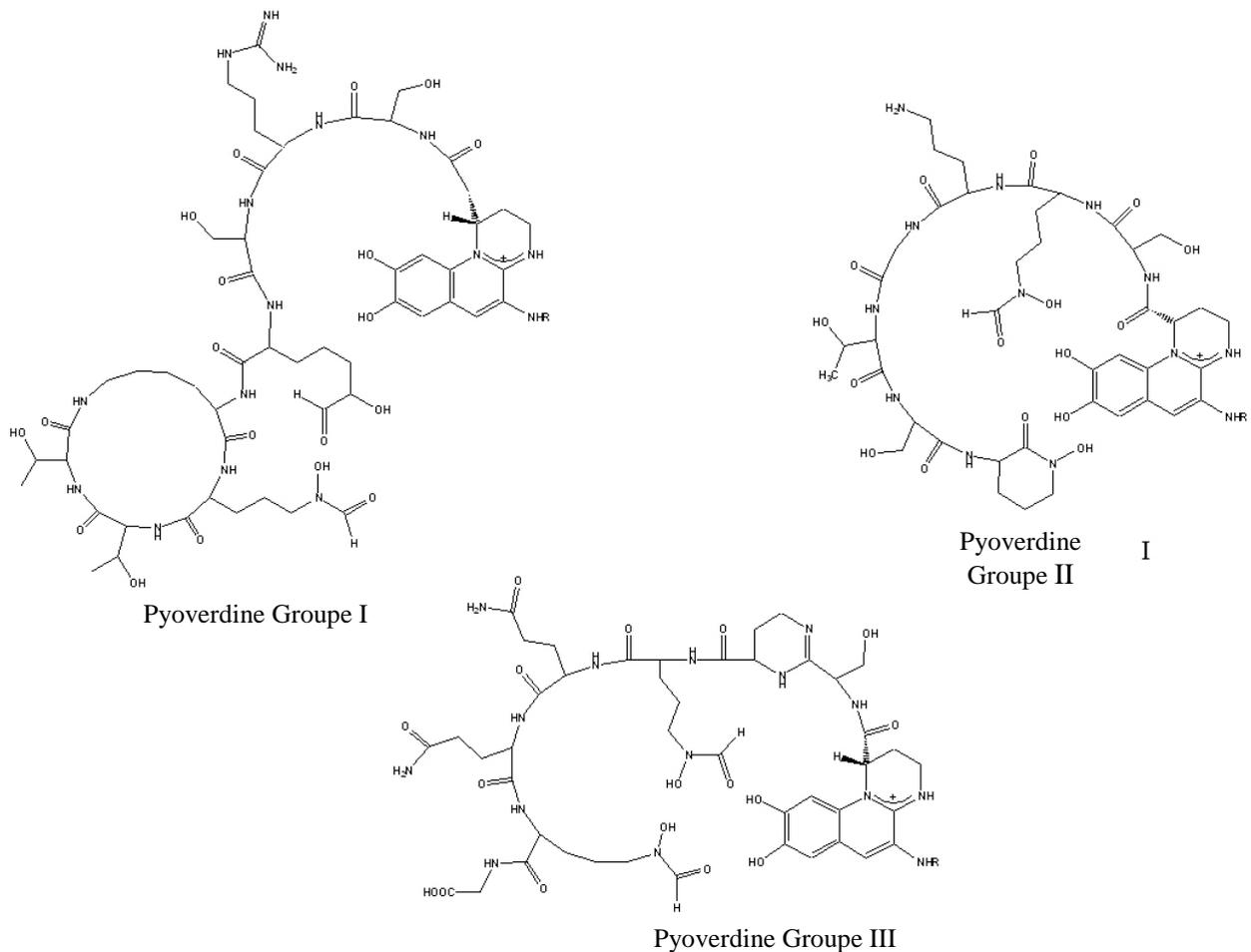
- Le métal peut être directement impliqué dans la voie de synthèse ou de régulation de la synthèse des sidérophores ;
- D'autres métaux que le FeIII, tels que ceux cités précédemment, peuvent complexer les sidérophores libres réduisant ainsi leur concentration dans le milieu et stimulant ainsi leur production ;
- L'induction de gènes codant pour la production de sidérophores peut être combinée aux gènes de résistance aux métaux, limitant ainsi leur toxicité.

### **Pyoverdine**

La pyoverdine (Pvd) est une molécule complexe (1500 Da) composée d'un dérivé dihydroxyquinoline formant le chromophore fluorescent, d'une chaîne peptidique composée de 6 à 12 acides aminés selon la souche, et d'une chaîne latérale, comprenant en général un acide dicarboxylique (Meyer 2000). Les groupes hydroxamates participent à la fixation du FeIII avec le groupe catécholate du chromophore, formant un complexe octaédrique, avec une stoechiométrie de 1:1 et une constante d'association de  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  à pH 7,0 (Albrecht-Gary *et al.* 1994). La fluorescence des Pvd est « quenchée » (éteinte) par coordination avec le FeIII, ce

dernier inhibant la production de sidérophores dès 10  $\mu\text{M}$  (Abdallah 1991; Díaz de Villegas *et al.* 2002).

Chez les *Pseudomonas* fluorescents, la synthèse des Pvd et de leurs récepteurs est régulée négativement par le répresseur Fur, qui lié au FeII, contrôle la transcription d'un facteur sigma extracytoplasmique, PvdS, ce dernier activant l'expression des gènes de synthèse de la pyoverdine (Visca *et al.* 2002). Certaines *P. putida* ou *P. fluorescens* ont la capacité d'utiliser un large spectre d'hétérologues de Pvd, alors que leurs Pvd ne peuvent être utilisées par des *Pseudomonas* compétitrices (Cornelis et Matthijs 2002). Meyer *et al.* (1999) ont montré que les récepteurs pour la Pvd de *P. aeruginosa* pouvaient également reconnaître deux autres Pvd de *P. fluorescens* PL7 et PL8. *P. aeruginosa* est également capable d'utiliser des sidérophores hétérologues tels que l'entérobactine d'*E. coli*, la ferroxiamine B et le citrate par le biais de récepteurs membranaires inductibles (Cornelis et Matthijs 2002; Poole et McKay 2003). Pour les espèces de *P. aeruginosa*, trois types de Pvd peuvent être distingués, chacun reconnu par un récepteur spécifique (**figure 1.11**) (Poole et McKay 2003).



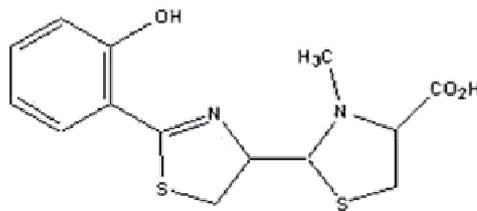
**Figure 1.11** : Différents types de pyoverdines produites par *P. aeruginosa* (Poole et McKay 2003).

Globalement la régulation de la production des sidérophores chez les *Pseudomonas* est complexe et ne dépend pas seulement de l'état du fer dans la cellule. Il existe des interactions entre les différents facteurs tels que le quorum sensing\*, le stress de survie, la régulation de la production d'autres métabolites secondaires, ou le stade de croissance (Hofte *et al.* 1994; Stintzi *et al.* 1998; Whiteley *et al.* 1999).

### Pyochéline

La pyochéline (Pch) est un sidérophore peu soluble dans l'eau, de faible poids moléculaire (325 Da) (Cox *et al.* 1981) (**figure 1.12**). La Pch se lie au FeIII avec une stoechiométrie de 2 molécules pour un atome de Fe et a une faible constante d'affinité avec ce dernier dans le méthanol de  $2.10^5 \text{ M}^{-1}$  (Cox *et al.* 1981).

La différence de structure entre pyochéline et pyoverdine suggère qu'un de ces sidérophores est impliqué dans le transport de métaux de transition et l'autre dans le transport du Fe. Les Pvd sont en effet connues pour se lier fortement aux cations trivalents (dont FeIII) et peuvent former un complexe octaédrique avec CrIII (Budzikiewicz *et al.* 2002). La Pch peut être un bon chélateur d'ions divalents du fait de sa faible constante de stabilité avec le FeIII, et est en effet connue pour former des complexes avec CoII, MoVI, ZnII, (Cuppels *et al.* 1987; Visca *et al.* 1992), le ZnII et le CoII stimulant la production de Pch (Höfte *et al.* 1993). L'ajout de CoII et MoVI complexés à la pyochéline stimulent plus fortement la croissance des bactéries par rapport à leur ajout sous forme de complexe avec la Pvd ou sous forme libre, ce qui laisse supposer que la Pch peut jouer un rôle dans leur acquisition (Visca *et al.* 1992).



Pyochéline

**Figure 1.12** : Structure de la pyochéline produite par les *Pseudomonas* (Poole et McKay 2003).

---

\* Voir glossaire

## 2.2.4. Techniques associées à la bioremédiation

### 2.2.4.1. Bioaugmentation

Le procédé de bioaugmentation requiert à la fois de cultiver en masse les microorganismes sélectionnés, une formulation efficace basée sur le contrôle micro-environnemental pour minimiser le temps de latence et maximiser les avantages compétitifs des microorganismes introduits et enfin, un système de distribution adapté au traitement envisagé. Les microorganismes sélectionnés doivent être « robustes » pour résister aux conditions environnementales parfois défavorables à leur survie et à leur activité. Les paramètres limitants incluent le pH, la proximité et la disponibilité des nutriments, la compétition avec les microorganismes autochtones et la microfaune, la température, l'humidité, les flux de gaz.

Pour faciliter la survie et la colonisation des microorganismes inoculés, différentes techniques de bioaugmentation ont été proposées (Gentry *et al.* 2004) :

- Bioaugmentation avec des cellules encapsulées dans une matrice ;
- Bioaugmentation avec des gènes de remédiation de façon à les transférer aux microorganismes indigènes ;
- Bioaugmentation de la rhizosphère qui sert de niche écologique aux microorganismes inoculés.

La bioaugmentation des sols s'applique à la nutrition des plantes, pour augmenter leur croissance, au contrôle des phytopathogènes (lutte biologique), à l'amélioration de la structure du sol, à la minéralisation des polluants organiques, à la bioaccumulation ou à la biolixiviation des polluants inorganiques (van Veen *et al.* 1997). La bioaugmentation d'espèces microbiennes a été largement utilisée pour la fixation d'azote avec *Rhizobium* ou *Frankia* (van Veen *et al.* 1997).

D'autres microorganismes non symbiotiques ont également fait l'objet d'expérimentations et d'applications pour améliorer la croissance des plantes, parmi les genres suivants : *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* (Kennedy *et al.* 2004) *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Khan et Khan 2002).

#### Suivi des cellules inoculées

Afin de suivre le devenir des cellules inoculées tout en les distinguant des microorganismes indigènes, l'insertion de gènes de fluorescence et des techniques de « monitoring » *in situ* ont été développées (**tableau I.8**). Le gène codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) est l'un de ceux les plus utilisés avec le gène *lux*, en tant que marqueurs non invasifs des cellules et peut également être utilisé pour la détection d'une activité spécifique. L'un des principaux avantages de la GFP est qu'elle permet d'identifier l'organisme inoculé *in*

*situ*, indépendamment de son état physiologique et ne nécessite pas d'ajout de substrats exogènes pour sa révélation (Bloemberg *et al.* 1997).

**Tableau I.8** : Méthodes pour le suivi de la survie et de l'activité microbienne (Gentry *et al.* 2004).

Méthode	Paramètre mesuré	Avantages	Références
<b>PCR ADNr 16S</b>	Présence	Simple, faible coût. Non quantitatif. Les produits PCR peuvent être analysés par d'autres méthodes (RFLP, TTGE, etc.) pour augmenter la spécificité.	(Lendvay <i>et al.</i> 2003)
<b>RT-PCR</b>	Activité	Détermine l'expression des gènes. Peut être combiné à la PCR en temps réel pour être quantitatif.	(Sayler <i>et al.</i> 2001)
<b>PCR en temps réel</b>	Présence / activité	Rapide, quantitative. Très sensible, permet de détecter moins de 10 <sup>4</sup> cellules/g de sol. Peut être combinée à la RT-PCR pour mesurer l'expression des gènes	(Rodrigues <i>et al.</i> 2002)
<b>Hybridation par fluorescence</b>	Présence / activité	Permet de visualiser, énumérer et identifier les microorganismes <i>in situ</i> sans culture. Quantitatif. Permet d'analyser des communautés complexes en utilisant des sondes multiples.	(Bakermans et Madsen 2002)
<b>Micropuces ADN</b>	Présence / activité	Analyse simultanée de centaines de gènes. Sensibilité plus basse que les autres méthodes. Plus de 5% d'une population microbienne peut être nécessaire pour détecter un microorganisme dans la communauté analysée. Peut être quantitatif	(Wu <i>et al.</i> 2001)
<b>Gènes indicateurs</b>	Présence / activité	Possibilité de visualiser les microorganismes <i>in situ</i> . Quantitatif. Les gènes luminescents permettent aussi de mesurer l'expression de gènes divers <i>in situ</i> . Etude de multiples organismes. Nécessite une modification génétique de l'hôte.	(Leveau et Lindow 2002)

#### 2.2.4.2. Survie microbienne

Une des préoccupations majeures de la bioaugmentation du sol par des microorganismes est leur survie, qui est influencée par plusieurs facteurs : (1) la présence de certains composés pouvant inhiber la croissance ou l'activité des microorganismes cibles, (2) la présence de prédateurs tels que les protozoaires ou les bactériophages, (3) l'incapacité à migrer dans le sol et par conséquent à être en contact avec des nutriments, (4) la faible disponibilité de certains nutriments (van Veen *et al.* 1997).

Les microorganismes inoculés sont avantagés s'ils sont impliqués dans un processus spécifique qui leur donne un avantage sélectif dans le sol. En revanche, en l'absence de processus spécifique, seul un inoculum important peut apporter un avantage compétitif au microorganisme inoculé afin d'obtenir *in fine* une population suffisante (Duquenne *et al.* 1999).

En général, la population bactérienne introduite décroît plus ou moins rapidement après inoculation dans le sol. Le déclin s'explique le plus souvent par la pauvreté en nutriments dans le sol et à « l'hostilité » du milieu pour des microorganismes pré-cultivés en laboratoire dans des conditions optimales. Par exemple, le déclin de *Pseudomonas fluorescens* est de 0,3 à 1,3 log tous les 10 jours selon le type de sol, le type de souche, son potentiel génétique et ses caractéristiques physiologiques (van Elsas *et al.* 1992). L'inoculation d'un sol avec *Bacillus subtilis* a montré que la population diminuait jusqu'à atteindre le nombre de spores présentes initialement dans l'inoculum et restait constante et sous forme sporulée durant 120 jours (van Elsas *et al.* 1986). Les déterminants de l'efficacité de la bioaugmentation sont de nature abiotique (texture, pH, température, humidité, disponibilité des substrats) et biotiques (compétition, prédation, antagonisme) (**tableau I.9**).

**Tableau I.9** : Facteurs influençant la survie des microorganismes inoculés dans un sol (van Veen *et al.* 1997).

Origine	Facteur	Effet
Biotique	Prédation	• Réduit la taille de la population
	Compétition	• Réduit la taille de la population • Effet antagoniste avec les microorganismes indigènes par compétition pour Fe
	Croissance racinaire	• Augmentation de la survie microbienne grâce au relargage de composés organiques (rhizodépôts)
Abiotique	Minéraux argileux	• Protection contre la prédation
	Tension de l'eau	• Forte tension : eau non disponible, forte osmolarité • Faible tension : anaérobiose par effet d'engorgement de la porosité du sol, augmentation de la disponibilité des nutriments par diffusion
	Carbone organique	• Carence en C organique se traduit par une diminution de la croissance et de l'activité d'où sélection des espèces oligotrophes
	Nutriments inorganiques	• Diminution de la colonisation du sol si carence
	pH	• Sélection des espèces, modification de la disponibilité de nutriments (P) et/ou de composés toxiques (ex : Al <sup>3+</sup> )
	Température	• Affecte l'activité métabolique et la pression biotique (prédateurs)
	Substances chimiques toxiques	• Inhibition des organismes les plus sensibles, sélection des « biodégradeurs » et/ou des microorganismes résistants ou tolérants

### **Facteurs abiotiques**

Les facteurs abiotiques peuvent agir directement ou indirectement (en influant sur la microflore indigène) sur les microorganismes inoculés qui, en général, colonisent les zones qui leur sont chimiquement favorables (van Veen *et al.* 1997).

La survie des microorganismes inoculés peut être notamment affectée par la texture et la structure du sol (Rutherford et Juma 1992). En effet, les *Pseudomonas* fluorescents survivent mieux dans un sol argileux que dans un sol sableux (Araujo *et al.* 1994; van Elsas *et al.* 1986). Les relations de prédation nématodes-protozoaires-bactéries sont de fait influencées par la taille des pores du sol, qui peuvent constituer une barrière physique à la prédation (Heijnen et van Veen 1991).

La disponibilité des nutriments dans le sol non rhizosphérique est souvent faible et conduit à considérer ce sol comme globalement oligotrophe pour la microflore présente (Pointdexter 1981). La stérilisation du sol par rayons gamma augmente la disponibilité des nutriments (C, N, P) issus de la biomasse morte ce qui se traduit par un comportement différent des microorganismes inoculés dans un sol stérilisé ou non (Postma *et al.* 1990). Selon ces auteurs, la population finale obtenue dans les sols stérilisés représente par conséquent « l'espace écologique » potentiel, en termes de nutriments et d'espace disponibles.

La sorption des microorganismes à la surface des particules de sol, notamment grâce à la production d'exopolysaccharides, et leur confinement dans les micropores empêchent souvent la dispersion de ces derniers et réduit leur activité car les substrats sont alors moins disponibles (van Veen *et al.* 1997). Pour remédier à cela, les techniques visant à augmenter la dispersion des microorganismes inoculés dans le sol utilisent des bactéries ayant perdu leur faculté d'adhérer aux surfaces, des ultra-microbactéries ou des surfactants. Dans les deux premiers cas, l'activité métabolique des microorganismes peut être affectée, quant aux surfactants ajoutés, certains d'entre eux peuvent être toxiques pour les microorganismes. Une autre approche consiste à ajouter à l'inoculum microbien des biosurfactants qui procurent à la fois un effet protecteur contre la toxicité des métaux et augmentent la quantité de substrats organiques à disposition des microorganismes (Maier *et al.* 2001).

### **Facteurs biotiques**

L'état physiologique des cellules joue un rôle très important pour leur survie et leur capacité à coloniser le sol. Ceci est d'autant plus essentiel que la densité de colonisation de la rhizosphère est liée à la capacité de migration de microorganismes et à l'utilisation des substrats. L'état physiologique des cellules n'est pas uniforme et dépend du micro-habitat dans lequel elles se trouvent (van Overbeek *et al.* 1995).

Une des causes majeures d'échec suite à la bioaugmentation du sol est la prédation par les protozoaires (Habte et Alexander 1975). Ces derniers sont impliqués dans la régulation des populations bactériennes mais on dispose de peu de connaissances sur une éventuelle spécificité des prédateurs vis à vis de celles-ci. Les bactéries à croissance lente (stratégies K) sont désavantagées et subissent une pression biotique plus importante que les espèces à forte croissance (stratégie r) (van Veen *et al.* 1997). Le second facteur biotique qui peut affecter les microorganismes inoculés, concerne la compétitivité des microorganismes pour les nutriments du sol.

### **Facteurs d'inoculation**

Deux aspects doivent être envisagés pour garantir une meilleure survie des microorganismes inoculés : une sélectivité écologique et/ou une protection à l'aide de matrices. La sélectivité écologique peut être obtenue en utilisant des antibiotiques sélectifs auxquels résiste naturellement le microorganisme d'intérêt ou en le modifiant génétiquement ou par utilisation d'un substrat spécifique non disponible pour les microorganismes indigènes (biostimulation sélective couplée à la bioaugmentation). Cette dernière option a été utilisée par Devliegher *et al.* (1995), en utilisant une souche de *Pseudomonas* adaptée à la dégradation de détergents en tant que source de carbone. L'application de ces détergents a permis d'augmenter la population des *Pseudomonas* inoculées de 100 à 1000 fois et par conséquent la colonisation racinaire du maïs. Cependant dans la plupart des cas, les microorganismes inoculés ne présentent pas d'avantage écologique spécifique. La biostimulation aspécifique des microorganismes inoculés avec l'ajout de substrats carbonés tels que le glucose ou l'amidon à 1% améliore néanmoins la survie des bactéries après 55 jours d'incubation et augmente l'activité phosphatase (Kim *et al.* 1998). L'apport de glucose en faible quantité (1 g/kg de sol sec) réduit le temps de latence de la dégradation du carbofuran lorsque le sol est bioaugmenté avec un fort inoculum de bactéries Gram<sup>-</sup> ( $1.10^7$  UFC/g de sol) (Duquenne *et al.* 1996). En revanche, une forte concentration en glucose (10 g/kg de sol sec) diminue le taux de dégradation quelle que soit la taille de l'inoculum, ce qui peut s'expliquer par une modification de la compétition entre microorganismes au profit des microorganismes indigènes.

Plusieurs critères inhérents à la méthode d'introduction et de pré-culture de l'inoculum influent sur le succès de la bioaugmentation. Des différences dans la dynamique de colonisation ont été démontrées entre des bactéries d'une même souche, obtenues en condition de laboratoire ou, isolées à partir du sol à inoculer (Senoo *et al.* 1992). La préincubation de l'inoculum dans un sol stérile avant inoculation dans un sol non stérile peut contribuer à augmenter la survie microbienne.



Tel est le cas avec *P. fluorescens* dont la survie a augmenté de 2 Log après 1 mois, alors que l'ajout de bactéries directement dans le sol n'était plus détectable à la même période (van Dyke et Prosser 2000). Cet effet peut s'expliquer par une adaptation préalable de la bactérie aux conditions du sol avant d'être confrontée aux prédateurs.

Une autre approche de la bioaugmentation du sol est l'utilisation d'un sol activé directement, c'est à dire un sol préalablement exposé aux contaminants et qui contient une ou des population(s) de microorganismes capables d'éliminer le polluant. Les avantages reconnus sont (1) l'inoculation de consortia plus efficaces que des cultures pures, (2) l'absence de cultures *ex situ* de façon à ne pas perdre leur capacité à être compétitifs, (3) la possibilité d'utiliser des microorganismes non cultivables (Gentry *et al.* 2004).

La taille de l'inoculum influence la survie et l'efficacité de la bioremédiation. Ramadan *et al.* (1990) ont observé que l'augmentation de la taille de l'inoculum réduisait la phase de latence pour la croissance et la dégradation de l'atrazine. Des inoculations successives peuvent aussi favoriser la colonisation du sol. L'étude menée par Newcombe et Crowley (1999) a montré qu'une inoculation tous les 3 jours avec *Pseudomonas* sp. multipliait par 28 l'efficacité de la dégradation de l'atrazine après 12 semaines d'incubation par rapport à une inoculation unique.

#### 2.2.4.3. Immobilisation

Dans les environnements naturels, les microorganismes se regroupent souvent pour former un micro-environnement qui leur permet de se protéger. De ce fait, une grande partie de la population est immobilisée ou fixée dans une matrice polymère, dans un espace défini, par la formation de biofilm ou de floccs. La production de polymères par ces microorganismes permet d'assurer leur cohésion, la protection contre les prédateurs et la dessiccation, une stabilité enzymatique et une plus grande facilité d'utilisation des nutriments.

Afin de contrôler les paramètres liés à la bioaugmentation des microorganismes, des techniques d'immobilisation artificielles de microorganismes ont été développées.

Le but de ces techniques d'immobilisation est de limiter les variations des conditions physico-chimiques et biologiques dans l'environnement immédiat des microorganismes, afin de favoriser l'adaptation de ces derniers à leur nouvel environnement, en réduisant le temps de latence, et ainsi d'optimiser la bioaugmentation (van Elsas et Heijnen 1990).

La bioaugmentation de sols avec des microorganismes immobilisés crée des « hot spots » où l'activité des cellules inoculées est importante si les conditions de développement sont favorables (van Veen *et al.* 1997).

Différents supports et différentes techniques peuvent être employés pour la production d'inocula immobilisés (**tableau I.10**). Il s'agit :

➤ De l'**adsorption** microbienne sur de la tourbe, de la vermiculite, des particules minérales (argile, zéolites) ou encore de boues ;

➤ Du **piégeage** ou encapsulation dans des matrices polysaccharidiques ou des capsules.

Selon (van Veen *et al.* 1997), un support idéal doit fournir un environnement adéquat pour la survie cellulaire et la croissance se traduisant globalement par une activité microbienne accrue ; être non toxique pour l'inoculum et l'environnement, et servir de moyen de contrôle des microorganismes inoculés. La matrice ne doit pas limiter la circulation des gaz et liquides tout en « tamponnant » les variations brusques des conditions environnementales (température, pH, teneurs en polluants, etc.)

Ces supports peuvent être utilisés soit directement pour inoculer le sol, soit en enrobage de graines pour inoculer le rhizoplan et/ou la rhizosphère. Les matrices toxiques pour l'environnement ont été écartées dans cette étude car le support d'immobilisation ne peut être récupéré après ajout dans le sol.

### **Immobilisation avec des matrices organiques**

L'immobilisation microbienne dans de l'alginate ou des carraghénanes sont des techniques « douces » qui permettent de préserver la viabilité des cellules par adaptation progressive aux conditions du milieu.

➤ **Alginate** : l'acide alginique est un polysaccharide composé d'acide D-mannuronique et d'acide L-glucuronique, obtenu à partir de différents types d'algues : *Macrocystis*, *Fucus*, *Laminaria*, mais l'alginate est également produit par certaines *Pseudomonas* lors de la formation de biofilms, ce qui en fait un support tout à fait adapté pour ces bactéries (Cancela *et al.* 2003).

Plusieurs auteurs estiment que l'encapsulation de cellules de *P. fluorescens* dans des billes d'alginate augmente leur survie dans le sol par rapport à l'inoculation de cellules libres, et augmente l'efficacité de la colonisation racinaire (Trevors *et al.* 1993; van Elsas *et al.* 1992). Une autre étude montre également que l'encapsulation de *P. aeruginosa* UG2Lr dans des billes d'alginate de calcium à 2% augmente la survie des cellules dans des microcosmes de sol ainsi que la colonisation du sol après 9 semaines par rapport aux cellules libres (Hall *et al.* 1998).

**Tableau I.10** : Propriétés des différents matériaux utilisés pour l'immobilisation des inocula (Gentry *et al.* 2004; Willaert et Baron 1996).

Supports d'immobilisation/ substrats	Avantages	Inconvénients	Références
Agar et agarose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relargage en continu des cellules</li> <li>• Non toxique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coûteux</li> <li>• Fabrication à chaud, mortalité de l'inoculum si le microorganisme ne supporte pas une température de 35-45°C</li> </ul>	(Vassilev <i>et al.</i> 1997) (El-Komy 2005)
Alginate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contrôle de l'inoculum et du relargage</li> <li>• Adaptation progressive de l'inoculum aux conditions du milieu</li> <li>• Relargage progressif</li> <li>• Fabrication à froid des billes</li> <li>• Inoculum maximum : 10<sup>11</sup> UFC/g bille</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hétérogénéité de la bille</li> <li>• Influence de la composition du milieu, dégradation rapide si présence de nutriments et/ou de phosphate</li> <li>• Changement des propriétés du gel si inoculum &gt; 10<sup>5</sup> UFC/g bille</li> </ul>	(Trevors <i>et al.</i> 1992)
Argile (vermiculite ou bentonite)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Matériau naturel</li> <li>• Processus d'immobilisation simple</li> <li>• Capacité élevée de rétention en eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de contrôle de l'inoculum</li> <li>• Diffusion rapide des substrats</li> <li>• Problème de contact avec le substrat</li> <li>• Propriétés physiques éventuellement affectées si apport de fortes quantités d'argile au sol (&gt;5%)</li> <li>• Dessiccation possible de l'inoculum</li> </ul>	(Duquenne et Cartroux 1998) (Moenne-Loccoz <i>et al.</i> 1999)
κ-carraghénanes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plus résistant et moins cher que l'alginate</li> <li>• Gels thermo-réversibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fabrication à chaud, mortalité de l'inoculum si le microorganisme ne supporte pas une température de 35-45°C</li> </ul>	(Gardin et Pauss 2001)
Pulpe de betterave sucrière (sugar beet waste)*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu coûteux</li> <li>• Augmente la stabilité des agrégats du sol</li> <li>• Rôle de support et de substrat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formation possible de complexes et adsorption avec les métaux</li> <li>• Pas de contrôle de l'inoculum</li> <li>• Non spécificité du substrat</li> </ul>	(Medina <i>et al.</i> 2006)
Tourbe	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Matériau naturel</li> <li>• Coût réduit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de contrôle de l'inoculum</li> <li>• Dessiccation rapide des bactéries inoculées avec ce support</li> <li>• Inoculum maximum : 10<sup>8</sup> UFC/g</li> <li>• Problème de phytotoxicité si stérilisation</li> </ul>	(Fouilleux <i>et al.</i> 1994) (Bashan 1998) (Trevors <i>et al.</i> 1992)

\* résidu lignocellulosique : 29% cellulose, 23% hemicellulose, 5% lignine.

La formation des billes de gel se fait par contact direct entre l'alginate de sodium et le plus souvent du  $\text{CaCl}_2$ . Les cations  $\text{Ca}^{2+}$  se logent dans des cavités électro-négatives induisant une conformation tridimensionnelle en « boîte à oeufs\* » (Grant *et al.* 1973).

Le contre-ion  $\text{Ca}^{2+}$  diffuse ensuite vers le centre de la bille, ce qui fait que la bille ne possède pas forcément une structure homogène – l'extérieur de la bille est plus rigide que l'intérieur. De faibles concentrations en contre-ions (0,05 à 0,1M) et des temps de polymérisation plus longs sont préférables pour avoir des gels plus homogènes et plus résistants (Trevors *et al.* 1992).

La stabilité des billes d'alginate de calcium dépend fortement des conditions du milieu dans lequel elles sont inoculées. En présence de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , le  $\text{Ca}^{2+}$  de l'alginate est relargué par échange d'ions et les billes sont fragilisées (Czaczyk *et al.* 1997). De même, d'autres substances telles que l'EDTA, les citrates ou les phosphates peuvent dissoudre l'alginate ou diminuer sa stabilité en complexant les ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les dérivés carboxyliques des polysaccharides de l'alginate sont chargés négativement dans un milieu neutre ou alcalin et ont donc une grande affinité pour les cations qui peuvent être fixés par échange d'ions avec les protons des groupements carboxyliques. Les billes seules peuvent en effet fixer jusqu'à 20 mg  $\text{Hg}^{2+}$ /g de bille (Arica *et al.* 2004) et jusqu'à 75 mg de  $\text{Cr}^{3+}$ /g de bille (Ibanez et Umetsu 2004). L'alginate de sodium peut également fixer un grand nombre de molécules de  $\text{Fe}^{3+}$  et former ainsi un complexe stable dont la constante de fixation est de  $1.10^4 \text{ M}^{-1}$  (Sreeram *et al.* 2004).

Les composés neutres de faible poids moléculaire diffusent facilement à travers l'alginate de calcium (Kierstan et Bucke 1977), suggérant que les métabolites secondaires produits par les microorganismes immobilisés ressortent des billes par diffusion (Zezza *et al.* 1993). Par exemple, *P. fluorescens* piégé dans des billes d'alginate de Ca à 3% relargue dans le milieu des substances antibiotiques tels que des phloroglucinols (Russo *et al.* 1996).

L'utilisation de macro-billes (de 1 à 3 mm de diamètre) présente cependant un inconvénient majeur : la faible diffusion de l' $\text{O}_2$ , avec 80% du volume de la bille non adapté aux bactéries aérobies (Bashan *et al.* 2002). Les microorganismes aérobies ne peuvent croître qu'à moins de 300  $\mu\text{m}$  de la surface de la bille (Chen et Humphrey 1988; Omar 1993), la concentration cellulaire maximale étant observée à 100  $\mu\text{m}$  de la surface de la bille (Monbouquette et Ollis 1988). L'utilisation de microbilles (100 à 200  $\mu\text{m}$ ), réalisées grâce à un champ électrostatique pulsé à haute tension puis séchées et appliquées sous forme de poudre,

---

\* Ce modèle décrit l'emboîtement des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cavités situées entre deux chaînes polysaccharidiques.

pourrait faciliter la bioaugmentation et améliorer la survie car l'oxygène n'est plus limitant dans ce cas. Cette technique augmente néanmoins le taux de mortalité cellulaire au cours de la fabrication des billes (Bashan *et al.* 2002).

Afin de contrôler la vitesse et le taux de relargage cellulaire hors des billes, on peut moduler la résistance mécanique des billes d'alginate. Celle-ci peut être augmentée en ajoutant une enveloppe de chitosan, le procédé étant toutefois assez coûteux (Serp *et al.* 2000). Par ailleurs, l'incorporation de tourbe ou de bentonite dans les billes d'alginate permet de contrôler la teneur en eau des billes et donc d'augmenter la survie microbienne (van Elsas *et al.* 1992). Il semblerait cependant que l'immobilisation des *Pseudomonas* dans les billes alginate formulées avec de l'argile entraîne la mortalité d'un pourcentage non négligeable de bactéries durant le processus d'immobilisation (Fravel *et al.* 1985).

➤ **Carraghénane** : parmi les différentes formes de carraghénanes, seules les formes  $\kappa$  et  $\iota$  conviennent pour l'immobilisation cellulaire, le  $\kappa$ -carraghénane formant des gels thermo-réversibles avec les ions potassium (Chibata *et al.* 1987). L'utilisation de carraghénanes au lieu d'alginate peut être préférable du fait de sa plus forte résistance et de son faible coût bien que leurs propriétés soient proches en terme de survie microbienne (Cassidy *et al.* 1996). L'inconvénient majeur de ce composé est la température de formation des billes qui peut provoquer une mortalité cellulaire importante.

➤ **Déchets de betterave** : les déchets de betterave sont un résidu lignocellulosique produit durant le processus d'extraction du sucre. C'est un matériau économique utilisé en alimentation animale. Son utilisation a été testée en formulation avec *A. niger*, qui produit de l'acide citrique et transforme les résidus de betterave en sucres plus simples du fait de l'action d'enzymes hydrolytiques (Rodriguez *et al.* 1999). Ces sucres simples peuvent ensuite être utilisés par des organismes hétérotrophes. Dans ce cas, le support d'immobilisation sert aussi de source de substrats et peut être employé pour la co-inoculation de bactéries et de champignons. Cependant, l'ajout de matière organique au sol peut conduire à l'immobilisation des métaux par adsorption ou complexation (Bolan et Duraisamy 2003). Tel est le cas de la pulpe de betterave en solution aqueuse, qui peut fixer CdII, CuII, NiII, PbII, ZnII, du fait de la présence de groupements carboxyliques (Dronnet *et al.* 1997).

➤ **Tourbe** : c'est un matériau naturel mais qui, de par son hétérogénéité et la variabilité de sa composition, n'est pas toujours adapté (Trevors *et al.* 1992). Mélangée à l'inoculum bactérien, la réhydratation de la tourbe provoque une succion de l'eau qui soumet les bactéries à une dessiccation rapide et diminue leur nombre (Bashan 1998; Fouilleux *et al.* 1994).

La tourbe doit être stérilisée sous peine de perdre les microorganismes immobilisés qui entrent en compétition avec les microorganismes autochtones ou des prédateurs tels que les protozoaires. La stérilité peut être obtenue par radiation gamma qui entraîne parfois la libération de composés phytotoxiques (Yardin *et al.* 2000)..

#### 2.2.4.4. Couplage Immobilisation/biostimulation

L'ajout d'amendements dans les supports d'immobilisation permet, dans la plupart des cas, d'améliorer la survie des microorganismes inoculés. Mais l'accessibilité de ces substrats aux microorganismes indigènes peut diminuer leur effet positif sur la bioaugmentation (Duquenne *et al.* 1999).

Malgré la non-spécificité de la plupart des sources carbonées, leur proximité avec les microorganismes au sein des matrices d'immobilisation avantage compétitivement ces derniers par rapport aux microorganismes indigènes jusqu'à dégradation du support. Néanmoins, l'apport d'amendements peut se traduire par la diminution de la taille des pores et de l'espace libre pour les microorganismes (van Veen *et al.* 1997).

Tous les substrats ne peuvent être incorporés dans les supports en raison du risque de diffusion. Tel est le cas des sucres simples dans des billes d'alginate. Le glucose contenu dans des billes à 2% d'alginate diffuse en une trentaine de minutes après que les billes aient été ajoutées dans un milieu aqueux et ce, quelle que soit la concentration en glucose (5 à 300 g/L) (Tanaka *et al.* 1984).

Dans le cas des molécules de petite taille non chargées, la concentration en alginate des billes et/ou celle du CaCl<sub>2</sub> n'ont pas d'effet sur la diffusion. En revanche, dans le cas de molécules de poids moléculaire élevé (> 2.10<sup>4</sup> D), la diffusion est réduite (Tanaka *et al.* 1984). L'amidon peut être utilisé par conséquent, comme source de carbone et en tant que renforçateur des billes. Incorporé dans des billes d'alginate avec *Pseudomonas* sp., il permet d'améliorer la survie microbienne et l'activité dénitrifiante (Tal *et al.* 1999). De même, la co-immobilisation de *Pseudomonas fluorescens* dans des microgranules de silice avec du glycérol favorise sa croissance et sa survie dans le sol et lui donne un avantage compétitif, ce malgré la diffusion relativement rapide du glycérol à travers les pores des microgranules, ce qui en limite l'efficacité (Duquenne *et al.* 1999).

Un des substrats couramment utilisé en co-immobilisation dans les billes d'alginate de calcium est le lait écrémé (van Elsas *et al.* 1992). Alors que l'observation microscopique de billes seules montre une organisation de l'alginate de Ca en couches successives concentriques, la formulation avec le lait écrémé montre une organisation différente du réseau

macromoléculaire au sein des billes et une augmentation du nombre de microcolonies par rapport aux billes sans lait écrémé (Bashan 1986). Dans le cas de la production de composés acides dans la bille, l'utilisation de lait écrémé tamponne le pH mais accélère la dégradation des billes (Bashan 1986). La survie de *P. fluorescens* peut être augmentée en ajoutant de la bentonite en plus du lait écrémé (van Elsas *et al.* 1992). La bentonite incorporée fournit ainsi une barrière physique entre les cellules et le sol environnant et joue le rôle de renforçateur de la structure des billes permettant un relargage progressif des cellules (van Elsas *et al.* 1992).

## 2.3. Phytoremédiation

### 2.3.1. Techniques et limites

En matière de remédiation des sols, les méthodes physico-chimiques sont majoritairement utilisées, malgré leur coût élevé et leur impact négatif sur la structure et la vie biologique du sol. La phytoremédiation, technique peu coûteuse et écologique a été proposée en 1983 par Chaney et présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre *in situ*.

L'EPA (Agence pour la Protection de l'Environnement) définit la phytoremédiation comme étant « l'utilisation directe de plantes pour la réduction *in situ* des risques liés aux sols, boues et sédiments contaminés et aux eaux souterraines, par l'extraction, la dégradation ou le confinement des polluants» (EPA 2000). Plusieurs techniques basées sur ce principe ont été développées (**tableau I.11**).

La phytoremédiation étant une technique en émergence, les coûts réels ne sont pas encore généralisables mais les coûts estimés sont 50 à 80 % plus faibles qu'avec les méthodes physico-chimiques (**tableau I.6**, p21 et 23) (Glass 2000). Le marché de la phytoremédiation est en progression ; il représentait en France 50 millions d'euros en 1992 et a été estimé à 280 millions d'euros en 2005 (Trouvé 2006).

### 2.3.2. Phytoextraction

La phytoextraction représente la seule voie biologique d'extraction *in situ* des métaux et comporte de nombreux avantages vis à vis des sols pollués de façon diffuse, sur de grandes surfaces (**tableau I.12**). Cette technique est basée sur le prélèvement des métaux par des plantes dotées d'une capacité de résistance aux métaux, d'une croissance rapide, d'un système racinaire développé, d'une aptitude à produire beaucoup de biomasse et à être capable de transloquer les éléments vers les parties récoltables (Chaney *et al.* 1997; McGrath *et al.* 2002).

Tableau I.11 : Caractéristiques des différentes techniques utilisées en phytoremédiation

Techniques de phytoremédiation	Rhizofiltration	Phyto-stabilisation	Phytoextraction	Phytovolatilisation	Phyto-dégradation
Mécanismes	Accumulation, adsorption, précipitation	Complexation, adsorption, précipitation	Accumulation et Hyperaccumulation	Volatilisation	Dégradation rhizosphérique
Type de polluant	Inorganique	Inorganique	Inorganique	Organiques/inorganiques (As, Hg, Se)	Organiques (solvants chlorés, herbicides)
Substrats traités	Milieux aqueux	Sols, sédiments, boues	Sols, sédiments, boues	Sols, sédiments, boues	Eaux, sols, sédiments, boues
Plantes utilisées	<i>H. annuus</i> , <i>B. juncea</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>Zea mays</i>	Plantes exclusives ( <i>Agrostis tenuis</i> )	Hyperaccumulatrices ou accumulatrices à forte biomasse	Plantes modifiées génétiquement	Tout type de plante hébergeant des rhizobactéries
Avantages	Utilisation <i>in situ</i> et <i>ex situ</i>	Limite le risque de lixiviation et d'érosion Solution rapide	Utilisation <i>in situ</i> Adaptée aux pollutions diffuses	Dilution de la pollution dans l'air Pas de traitement des déchets végétaux	Pas de traitement des déchets végétaux
Inconvénients	Dépend du système racinaire	Dépend du système racinaire Nécessite une surveillance N° élimine pas le polluant du sol	Dépend du système racinaire Retraitement des déchets produits	Le risque d'exposition atmosphérique n'a pas été quantifié Utilisation d'OGM	Limité à des polluants facilement dégradables Dépend des rhizobactéries associées
Références	(Dushenkov <i>et al.</i> 1995)	(Cunningham et Berit 2000)	(Garbisu et Alkorta 2001) (McGrath et Zhao 2003)	(Chaney <i>et al.</i> 1997)	(Black 1995)



**Tableau I.12** : Avantages et inconvénients de la phytoextraction (Cunningham *et al.* 1995; Henry 2000).

<b>Avantages</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisé pour une grande diversité de polluants organiques/inorganiques</li> <li>• Application <i>in situ/ex situ</i></li> <li>• Diminution des perturbations pour le sol par rapport aux techniques conventionnelles</li> <li>• Réduit la quantité de déchets à stocker jusqu'à 95%</li> <li>• Diminution de la dispersion dans l'eau (lixiviation) et l'air</li> <li>• Méthode peu coûteuse en moyen humain et matériel</li> <li>• Facile à mettre en œuvre</li> <li>• Ecologiquement adaptée et esthétique</li> <li>• Limite l'érosion, maintien ou améliore la structure des sols</li> <li>• Impact positif sur la fertilité et la biodiversité des sols</li> </ul>
<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Restreint à des sites pollués peu profonds limités à 1 m dans les sols</li> <li>• Durée de remédiation longue</li> <li>• Restreint aux sites de faible contamination</li> <li>• Traitement des déchets potentiellement dangereux</li> <li>• Dépend des conditions climatiques</li> <li>• Risque d'affecter la biodiversité en introduisant des espèces non natives</li> <li>• Risque de consommation des tissus contaminés par les animaux par pâturage</li> </ul>

Plusieurs approches ont été développées :

- l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices ;
- l'utilisation de plantes à forte biomasse dont l'efficacité de prélèvement des métaux peut être augmentée par l'ajout de chélatants chimiques ou couplée à la bioaugmentation ;
- l'utilisation d'arbres à croissance rapide.

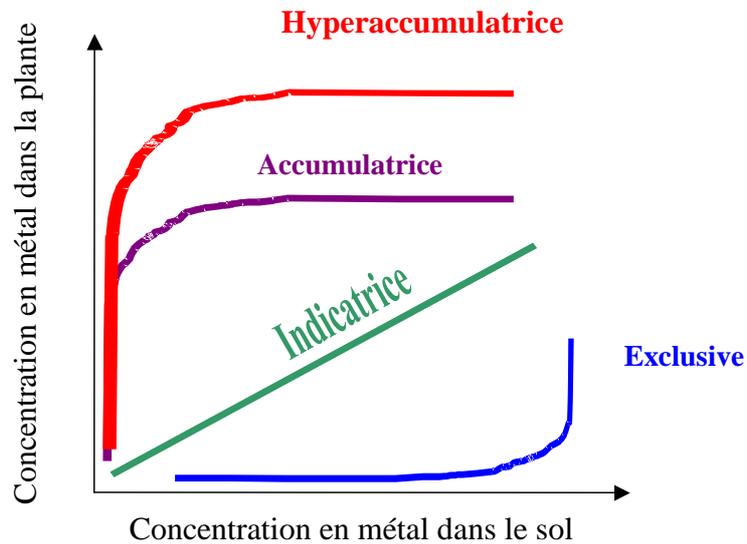
La durée de phytoextraction est l'un des facteurs limitants majeurs ; le traitement des sols pouvant atteindre plusieurs années, voire dizaines d'années (**tableau I.13**). Une durée raisonnable, inférieure à 5 ans, nécessite l'utilisation d'espèces à croissance rapide ou d'améliorer des plantes existantes par insertion de gènes responsables de l'hyperaccumulation qui n'ont à ce jour pas encore été découverts.

Selon Baker (1981), il existe trois catégories de plantes pouvant pousser sur des sols métallifères (**figure 1.13**) tels que les sols de serpentine (contenant Co, Cr, Mg, Mn et Ni), les sols sélénifères (sols riches en Se), uranifères, ou calaminaires (sols riches en Cd et Zn) (Raskin *et al.* 1994) :

- les exclusives qui maintiennent une faible concentration en métaux dans leurs feuilles quelle que soit la teneur du sol et qui sont principalement utilisées en phytostabilisation ;
- les accumulatrices et hyperaccumulatrices qui accumulent les métaux dans leurs parties aériennes indépendamment de la concentration du sol ;
- les indicatrices dont le prélèvement en métaux reflète la concentration du sol jusqu'à ce que la teneur dans le sol leur soit toxique.

**Tableau I.13** : Estimation de la durée de traitement pour réduire la concentration en Pb d'un sol de 100 mg/kg de sol sec sur 30 cm de profondeur en fonction des caractéristiques de production et d'accumulation la plante (Baker *et al.* 2000).

Concentration en Pb (mg/kg MS)	Biomasse végétale produite (t/ha/an)	Quantité de métal extrait (kg/ha/an)	Durée du traitement (en années)
<b>Non-hyperaccumulatrices</b>			
50	5	0,25	1800
50	10	0,50	900
50	15	0,75	600
50	20	1,00	450
50	25	1,25	360
500	5	2,50	180
500	10	5,00	90
500	15	7,50	60
500	20	10,00	45
500	25	12,50	36
<b>Hyperaccumulatrices</b>			
1000	5	5,00	90
10000	5	50,00	9
20000	5	100,00	4,5



**Figure 1.13** : Catégories de plantes poussant sur des sols métallifères (Baker 1981).

L'emploi de la phytoextraction se limite à des sites peu contaminés, tels que des sols agricoles. Par exemple, Blaylock (2000) a estimé que la phytoextraction du Pb par *Brassica juncea* ne pouvait s'appliquer qu'à des sites dont la teneur en métaux ne dépassait pas 1500 mg de Pb par kg de sol sec.

### Plantes accumulatrices et hyperaccumulatrices

La première découverte des plantes pouvant accumuler de fortes concentrations en Zn a été faite en 1885 par Baumann. En 1935, Byers recensait l'accumulation de Se par *Astragalus* spp, et en 1948, Minguzzi et Vergnano identifiaient des plantes pouvant accumuler plus de 1% de Ni dans leurs feuilles.

Le terme d'hyperaccumulateur a été ensuite défini comme étant une plante capable d'accumuler dans ses feuilles plus de (Baker et Brooks 1989; Baker *et al.* 2000; Reeves et Baker 2000) :

- 10 µg de Hg/g de MS (matière sèche) ;
- 100 µg de Cd/g de MS ;
- 1000 µg de As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se/g de MS ;
- 10 000 µg de Mn, Zn/g de MS.

Le phénomène d'hyperaccumulation est assez rare. Il existe environ 400 espèces hyperaccumulatrices soit moins de 0,2% des angiospermes, dont 300 accumulent préférentiellement le Ni (**tableau I.14**) (Salt 1995). La plupart des hyperaccumulateurs appartiennent à la famille des *Brassicaceae*, famille qui ne possède pas d'associations mycorhiziennes (McGrath *et al.* 2001).

Une des caractéristiques principales des espèces hyperaccumulatrices est de posséder un facteur de translocation (**FT**) – rapport de la concentration en métal dans les feuilles à la concentration en métal dans les racines – supérieur à 1. La plupart des plantes hyperaccumulatrices n'accumulent pas les métaux de la même façon selon leur nature. Par exemple, *A. halleri* est un hyperaccumulateur de Cd et Zn dans les feuilles mais accumule Cu et Pb dans les racines (Dahmani-Muller *et al.* 2001). A ce jour, aucune espèce végétale n'a encore montré des capacités d'hyperaccumulation d'un large spectre de métaux (Watanabe 1997) mais de nombreuses plantes hyperaccumulatrices potentielles restent encore à découvrir (Raskin *et al.* 1997).

**Tableau I.14** : Nombre d'espèces hyperaccumulatrices connues pour différents métaux et familles les plus représentées (Baker *et al.* 2000; Brooks *et al.* 1998; Dubourguier *et al.* 2001).

Eléments	Nombre d'espèces	Nombre de familles	Familles les plus représentées
As	2	1	<i>Pteridaceae</i>
Cd	2	1	<i>Brassicaceae</i>
Co	28	11	<i>Lamiaceae, Scophulariaceae</i>
Cu	37	15	<i>Cyperaceae, Poaceae, Lamiaceae, Scophulariaceae</i>
Mn	9	5	<i>Apocynaceae, Cunoniaceae, Proteceae</i>
Ni	317	37	<i>Brassicaceae, Cunoniaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae, Violaceae</i>
Pb	14	7	<i>Asteraceae, Brassiceae</i>
Se	20	7	<i>Fabaceae</i>
Tl	1	1	<i>Brassicaceae</i>
Zn	13	5	<i>Brassicaceae, Violaceae</i>

La plupart des plantes hyperaccumulatrices sont caractérisées par une faible biomasse et une croissance lente, ce qui les rend moins efficaces pour une utilisation à grande échelle par rapport aux espèces à forte biomasse (Baker *et al.* 2000; Reeves et Baker 2000). Par exemple *Thlaspi caerulescens* cultivé sur un site contaminé par Cd, Cu et Zn extrait 47 g de Cu/ha alors que du maïs cultivé sur la même parcelle en extrait 3 fois plus grâce à une plus forte production de biomasse (Keller et Hammer 2005). Par conséquent l'utilisation de plantes à forte biomasse s'est développée, en particulier des espèces cultivées : *Zea mays* (maïs), *Pisum sativum* (pois), *Avena sativa* (blé), *Hordeum vulgare* (avoine) et *Brassica juncea* (moutarde indienne).

Le point critique de la phytoextraction reste la biodisponibilité du métal dans le sol, influencée par les facteurs édaphiques dont le pH, la CEC et la teneur en matière organique. Une étude de Barona *et al.*(2001) suggère cependant que l'augmentation de la biodisponibilité des métaux dans le sol doit être en rapport avec les capacités d'extraction des métaux par les plantes sur une courte période, sous peine d'entraîner un risque potentiel de contamination des couches profondes de sol et des eaux souterraines.

Selon certains auteurs, les arbres pourraient être de bons candidats pour la phytoextraction du fait de leur capacité à croître sur différents substrats, de leur système racinaire développé et de leur forte production de biomasse (Pulford et Watson 2003). Les arbres ont un taux de transpiration très important ce qui facilite le transfert des ions métalliques vers les feuilles : un saule, par exemple, peut transpirer 19000 litres d'eau en un été (Hinchman *et al.* 1998). Cependant, les arbres ne sont pas capables de s'adapter à de fortes concentrations en métaux dans le sol, ce qui explique leur absence sur les sites métallifères d'Europe (Turner 1994), malgré une tolérance aux métaux plus marquée que pour la plupart des espèces cultivées (Pulford et Watson 2003). Une étude économique a pourtant révélé que le saule était adapté à la remédiation d'un sol agricole contaminé par du Cd (Lewandowski *et al.* 2006).

### 2.3.3. Interactions entre les métaux et les plantes

#### 2.3.3.1. Toxicité des métaux

Certains métaux sont des micro-nutriments essentiels à la croissance des végétaux (Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Ni et Zn) qui peuvent être toxiques à forte concentration alors que d'autres, non essentiels, sont toxiques à faible concentration (Ag, Al, Cd, Cr, Hg, Pb) (**tableau I.15**).

**Tableau I.15** : Concentration en éléments traces dans les parties aériennes de plantes (mg/kg MS) (Kabata-Pendias et Pendias 1992).

Elément	Teneurs normales	Teneurs en excès ou toxiques	Teneurs tolérables pour plantes de grande culture
Cd	0,05-0,2	5-30	3
Cr	0,1-0,5	5-30	2
Cu	5-30	50	50
Hg	-	0,5-1	-
Ni	0,1-5	10-100	50
Pb	5-10	30-300	10
Se	0,01-2	5-30	-
Zn	27-150	100-400	300

En excès, les métaux non essentiels provoquent aussi bien des chloroses et nécroses que des retards de croissance (inhibition de la croissance, racinaire notamment) (Williams *et al.* 2000). Au niveau cellulaire, cette toxicité peut se traduire par une fixation des métaux aux groupements thiols inhibant ainsi les activités enzymatiques, les synthèses protéiques ou

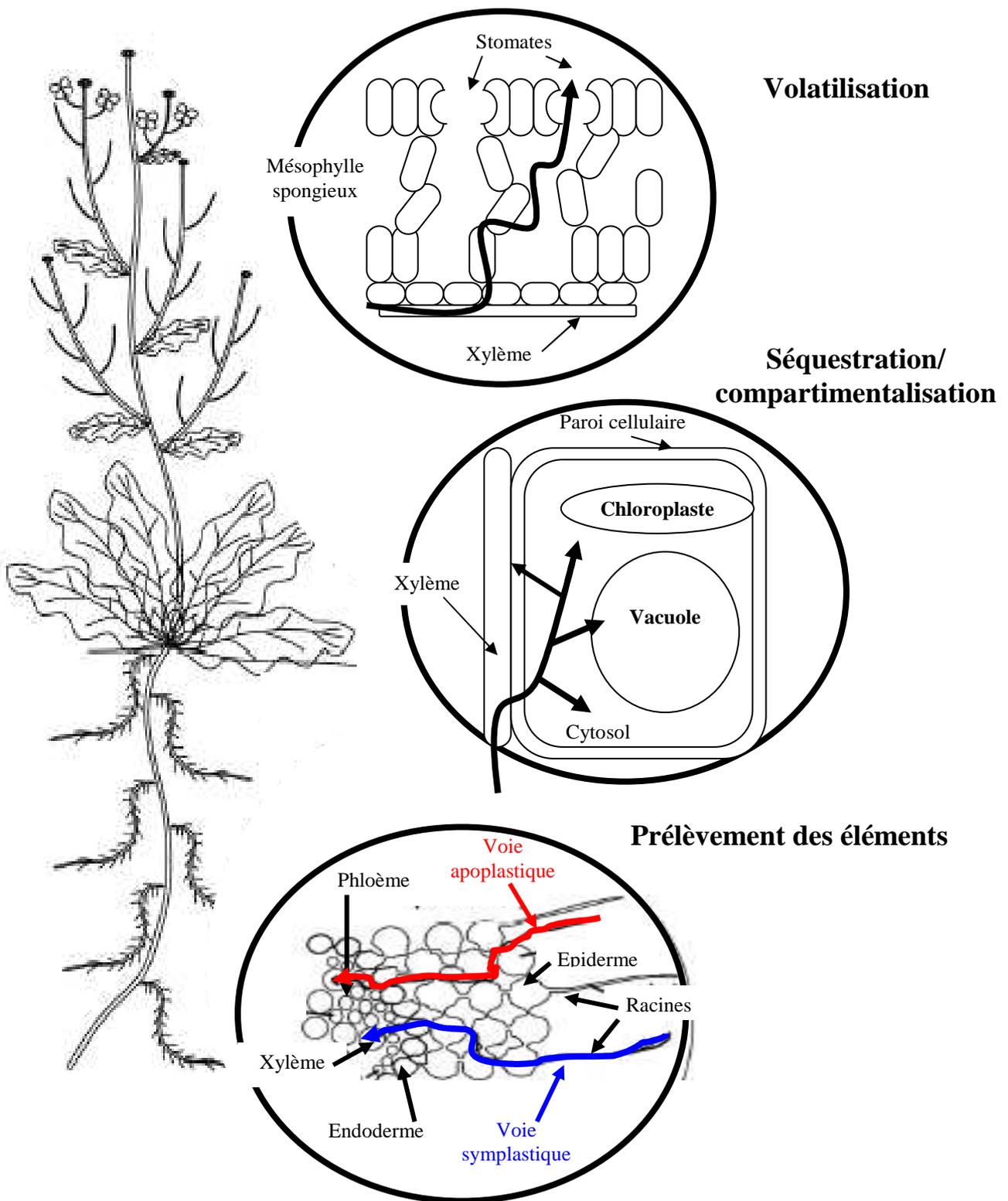
provoquant une carence d'ions essentiels par compétition (Assche et Clijsters 1990). Certaines monocotylédones non herbacées et les dicotylédones répondent aux chloroses, dues à une carence en Fe, en augmentant leur capacité racinaire à réduire le Fe(III) en Fe(II), forme assimilable par la plante (Chaney *et al.* 1972) ou en acidifiant la rhizosphère (Marschner et Römheld 1994). Bien que globalement les plantes hyperaccumulatrices soient tolérantes aux métaux, il n'existe pas de lien avéré entre la tolérance et l'hyperaccumulation (Baker *et al.* 1994; MacNair *et al.* 2000).

### 2.3.3.2. Absorption

Le prélèvement des éléments minéraux par les plantes dépend des paramètres suivants : (1) concentration en éléments potentiellement biodisponibles dans le sol, (2) activité et statut ionique des éléments dans la solution de sol, (3) transport des éléments à l'interface racine/sol. Les plantes prélèvent les métaux sous forme de cations ou sous forme soluble liée à la matière organique. Le rapport de la concentration en éléments dans les feuilles à celle mesurée dans le sol définit, selon Dahmani-Muller *et al.* (2000), le facteur de bioaccumulation ou de bioconcentration (**FB**) et permet ainsi de déterminer la capacité des plantes à absorber les métaux.

La plante est capable de mobiliser ou d'immobiliser les métaux en changeant les conditions rhizosphériques par la production d'exsudats racinaires, par extrusion de protons, de phytosidérophores ou d'acides organiques (**figure 1.14**) (Kinnersley 1993; Wenzel *et al.* 2003). Ces composés chimiques présents dans la rhizosphère sont impliqués dans l'augmentation du prélèvement des métaux et leur translocation vers les feuilles, bien que les mécanismes mis en jeu ne soient pas clairement définis (Mench et Martin 1991).

Pour maintenir un certain équilibre dans la rhizosphère, les racines libèrent des protons lorsqu'elles absorbent plus de cations que d'anions ou prélèvent des protons dans le cas contraire (Haynes 1990; Hinsinger *et al.* 2003). Par conséquent, le pH dans la rhizosphère est le plus souvent de 1 à 2 unités inférieur à celui du sol non rhizosphérique. Pour autant, aucun lien n'a été démontré entre le pH du sol rhizosphérique et le phénomène d'hyperaccumulation (Knight *et al.* 1997; McGrath *et al.* 1997).



**Figure 1.14 :** Voies de prélèvements des métaux par les plantes. Les métaux entrent par les racines par voie symplastique (en traversant les membranes cellulaires) et apoplastique (par les espaces intracellulaires). Une fois dans le xylème, les métaux sont transportés vers les feuilles où ils peuvent être séquestrés dans différents compartiments cellulaires (cytosol, paroi cellulaire, vacuole) ou être volatilisés par les stomates (d'après Peer *et al.*, 2006).

Les phytosidérophores, également impliqués dans la mobilisation des métaux, sont synthétisés par les graminées sous la forme d'acide mugénique ou avénique ou de nicotianamines (Kinnersley 1993; Ma et Nomoto 1996). Ces composés spécifiques sont excrétés dans la rizosphère notamment chez l'orge, en cas de carence en Fe ou en Zn (Gries *et al.* 1995; Marschner et Römheld 1994). Les phytosidérophores sont excrétés au niveau de l'apex où ils complexent les métaux tels que le Fe (Marschner *et al.* 1987), puis le complexe est récupéré par des transporteurs spécifiques de forte affinité sur la membrane plasmique des cellules racinaires (Marschner et Römheld 1994). Les phytosidérophores peuvent complexer d'autres métaux que le Fe dans le sol, tel que Cd, Ni, Zn (Awad et Romheld 2000; Shenker *et al.* 2001).

Les plantes exsudent également des acides organiques (citrique, malique, oxalique) et/ou des phosphatases acides en cas de carence en phosphore (Marschner 1998). Les acides organiques de faible poids moléculaire sont les principaux acteurs de la mobilisation des métaux (Al, Ca, Fe) et de l'accumulation de ceux-ci dans les plantes, soit en formant des complexes métalliques, soit en diminuant le pH (Haynes 1990; Hinsinger *et al.* 2003). La surproduction d'exsudats racinaires n'est cependant pas impliquée dans le mécanisme d'hyperaccumulation de Zn par *T. caerulescens* (Zhao *et al.* 2001).

### 2.3.3.3. Transfert et translocation

Une fois absorbés par les racines qui jouent le rôle d'échangeurs d'ions, les métaux traversent la membrane plasmique par des transporteurs ou des sites de fixation de plus forte affinité (Hirsch *et al.* 1998). Trois processus majeurs peuvent alors réguler le transfert des métaux des racines vers le xylème : (1) la séquestration des métaux dans les cellules racinaires, (2) le transport symplastique vers la stèle\*, (3) le relargage dans le xylème.

Dans la plante, les métaux sont souvent peu mobiles et forment des complexes insolubles avec les carbonates, les sulfates et les phosphates, les immobilisant dans les compartiments apoplastiques\* ou symplastiques\* (Raskin *et al.* 1997). L'immobilisation des métaux sur les parois cellulaires des racines peut être assimilée à une stratégie d'exclusion des métaux par la plante (Baker 1981; Dahmani-Muller *et al.* 2000). Les métaux non essentiels empruntent plutôt la voie apoplastique, perméable aux solutés, alors que les ions métalliques essentiels atteignent le xylème par la voie symplastique (Tester et Leigh 2001). Le transport des ions dans le xylème, dont CdII, CuII, PbII et ZnII, est contrôlé par les protéines de transport membranaires (Clemens *et al.* 2002; Williams *et al.* 2000). La chélation avec certains ligands tels que l'histidine, la nicotianamine et le citrate ont tendance à faciliter le transport des métaux dans le xylème alors

---

\* Voir glossaire



que la synthèse de phytochélatines et de métallothionéines favorise la séquestration dans les racines (Clemens *et al.* 2002).

Le transport des métaux du cytosol à la vacuole et leur séquestration sont considérés comme un mécanisme important de la tolérance et de l'accumulation des métaux. Cela les exclut des sites cellulaires où se déroulent des processus tels que la division cellulaire ou la respiration, procurant ainsi un effet protecteur (Hall 2002). Les ions métalliques peuvent être transportés activement par des systèmes ATP-dépendants à travers le tonoplaste, sous forme libre ou complexée (Ortiz *et al.* 1995). Une fois dans la vacuole, les métaux peuvent être complexés par des acides organiques ou des peptides détoxificateurs de métaux induits lors de l'exposition de la plante à ces métaux (glutathion, phytochélatines et métallothionéines) (Cunningham *et al.* 1995).

Le glutathion est le composé thiol majeur des plantes, présent majoritairement sous forme réduite (May *et al.* 1998). Les plantes qui subissent un stress métallique produisent des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives (ROS) et réduisent alors ce stress par la synthèse de glutathion, de phytochélatines ou de métallothionéines (Cobbett et Goldsbrough 2002; Rauser 1995). Les phytochélatines forment des complexes avec les nutriments et les métaux toxiques, tels que CdII, CoII, CuII, PbII, HgII, NiII et aident au transport dans les vacuoles où les métaux sont séquestrés (Meagher 2000; Salt et Rauser 1995; Vogeli-Lange et Wagner 1990). Les métallothionéines sont des protéines riches en cystéines, et forment des complexes avec les métaux dans l'ordre d'affinité suivant : BiII>HgII>AgI>CuII>CdII>PbII>ZnII (Kaegi et Schaeffer 1988). Les métallothionéines sont équivalentes fonctionnellement aux phytochélatines (Grill *et al.* 1987), bien que leur spécificité et leur rôle respectif *in vivo* n'ait pas été clairement élucidé (Hall 2002). Les trichomes\* apparaissent également comme jouant un rôle majeur dans la détoxification de métaux. C'est le cas pour le Cd avec *B. juncea* où l'accumulation dans les trichomes est 40 fois supérieure à celle mesurée dans la totalité de la feuille (Ager *et al.* 2002) et pour Ni et Zn respectivement chez *Alyssum lesbiacum* (Krämer *et al.* 1997) et *A. halleri.*(Küpper *et al.* 2000)

Le facteur de translocation **FT** est variable selon les espèces végétales et la nature des métaux : certains sont facilement transloqués vers les feuilles (Cd, Co, Mn, Ni, Zn) alors que d'autres s'accumulent préférentiellement dans les racines (Al, Cr, Cu, Fe, Pb) (Baker *et al.* 1994; Pulford et Watson 2003).

Chez les plantes hyperaccumulatrices, les taux plus élevés de translocation peuvent s'expliquer par la moindre séquestration des métaux dans les vacuoles racinaires en comparaison

---

\* Voir glossaire

de ce qui est observé chez les non hyperaccumulatrices (Singh *et al.* 2003). Il est d'ailleurs probable que les plantes hyperaccumulatrices aient un système de transport par le xylème plus efficace. L'exposition à Ni de plusieurs espèces d'*Alyssum* provoque une augmentation importante et proportionnelle des niveaux d'histidine dans le xylème (Kramer *et al.* 1996). Une réponse similaire a été observée chez deux autres plantes hyperaccumulatrices de Ni, *Streptanthus polygaloides* et *Berkherya coddii* (Smith *et al.* 1999). Cependant d'autres études ont montré que la réponse à l'histidine n'était pas universelle chez toutes les espèces accumulatrices de Ni (Salt et Kramer 2000). De fait, plusieurs mécanismes d'hyperaccumulation coexistent, y compris pour un métal donné.

#### 2.3.3.4. Cas du chrome

##### Toxicité

La toxicité du chrome vis à vis des plantes comme de tout organisme vivant varie selon sa forme chimique. C'est la réduction de CrVI en CrIII par les stades intermédiaires CrV et CrIV qui libère des radicaux libres OH• responsables de sa toxicité et des effets génotoxiques (Vazquez *et al.* 1987).

Les effets toxiques du Cr chez les plantes se traduisent le plus souvent par des chloroses et nécroses. Chez l'orge, la synthèse de polyamines dont la putrescine, principalement due à une exposition à CrVI, réduit la croissance, induit la synthèse de chitinase (facteur de stress) dans les feuilles, et diminue la croissance foliaire et la teneur en eau des feuilles (Banks *et al.* 2006).

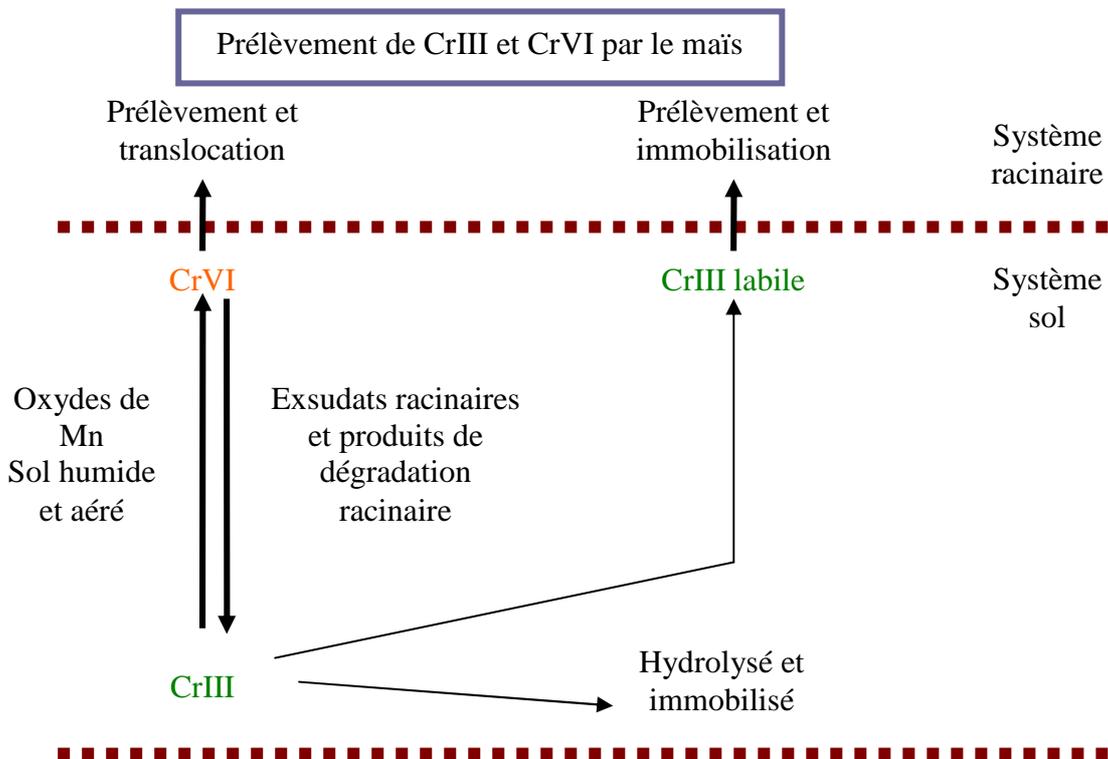
Le CrIII est en général moins toxique pour les plantes que le CrVI du fait de sa faible solubilité (Shahandeh et Hossner 2000). Cependant à de fortes concentrations, le CrIII peut causer de sérieux dommages dans les tissus et une diminution de la production de biomasse foliaire et racinaire pouvant atteindre 40 % pour 100 µM de CrIII alors que 100 µM de CrVI causent 75 % et 90% d'inhibition de croissance pour les feuilles et les racines respectivement (Shahandeh et Hossner 2000). Le CrIII intracellulaire est en effet un agent mutagène potentiel et peut inhiber l'ADN polymérase en déplaçant les ions MgII (Mishra *et al.* 1995).

La présence de CrVI peut modifier le prélèvement d'autres éléments, en augmentant notamment celui du Ca et du Fe par les racines et du Mg par les feuilles (Cary *et al.* 1977; Gardea-Torresdey *et al.* 2004) mais réduit le prélèvement de Mn et Zn. L'une des conséquences est la chlorose des feuilles supérieures observée chez les espèces de *Brassica* et *Datura*, probablement due à un effet indirect du Cr sur la translocation du Fe ou du Zn (Ghosh et Singh 2005a).

### Absorption racinaire

Dans le sol, le Cr est principalement lié à la matière organique majoritairement sous forme de CrIII réduisant ainsi sa phytodisponibilité (Han *et al.* 2004). Les exsudats racinaires et leurs produits de dégradation jouent un rôle important sur la mobilité du Cr, en augmentant les conditions réductrices du sol, ce qui peut conduire à la réduction de CrVI en CrIII moins mobile (James et Bartlett 1984). D'un autre côté, la plante peut libérer des agents complexants tels que les acides carboxyliques et les acides aminés qui peuvent faciliter le prélèvement de Cr et augmenter sa mobilité dans le sol (Mishra *et al.* 1995).

Le Cr peut être prélevé sous forme  $\text{Cr}^{3+}$  ou  $\text{CrO}_4^{2-}$ , le prélèvement de CrVI étant plus rapide que pour le CrIII (**figure 1.15**) (McGrath 1982). Le CrVI est en effet activement transporté *via* les transporteurs de fer/sulfate/phosphate et est en majorité réduit en CrIII dans les racines par les enzymes FeIII réductases (Schmidt 1996) alors que le CrIII est absorbé par un mécanisme passif plus lent et peut être retenu sur les sites d'échange cationiques des parois cellulaires (Skeffington *et al.* 1976). Plusieurs études montrent que quelle que soit la forme du Cr dans le milieu, seul le CrIII est présent dans les racines (Bluskov *et al.* 2005; Mishra *et al.* 1995; Zayed *et al.* 1998).



**Figure 1.15** : Schéma possible des variations dans le prélèvement de CrIII et CrVI dans et autour du système plante (Mishra *et al.* 1995).

### **Transport et accumulation**

La translocation et l'accumulation du Cr dans la plante dépendent du stade d'oxydation de la forme de départ, de la concentration dans le milieu et de l'espèce végétale. Il a été démontré que les plantes accumulaient plus de Cr lorsque celui-ci était sous la forme CrVI, et que le facteur de translocation du CrVI était de 2 à 4 fois supérieur à celui du CrIII, ce qui suggère un transport massif par le xylème (Shahandeh et Hossner 2000; Zayed *et al.* 1998). Le CrVI migre en effet plus vite dans le xylème que le CrIII probablement parce que ce dernier interagit électrostatiquement avec les parois cellulaires des vaisseaux. Le CrVI peut traverser aisément les membranes cellulaires par les transporteurs phosphates-sulfates et peut être transloqué vers les feuilles (Smith *et al.* 1989).

En revanche, le CrIII ne peut pas passer les membranes cellulaires, excepté lorsque le CrIII est lié à de l'acide oxalique, du malate ou de la glycine. Sa biodisponibilité augmente alors et il peut pénétrer les parois cellulaires (Srivastava *et al.* 1999). L'exposition au Cr provoque un changement de structure à la surface des feuilles et une augmentation du nombre de trichomes qui peuvent être des zones de stockage des métaux (Han *et al.* 2004; Vazquez *et al.* 1987). Globalement, les plantes accumulent surtout le Cr dans les vacuoles des racines par piégeage (Shanker *et al.* 2004).

### **Phytoremédiation**

Les dicotylédones (tournesol et moutarde indienne) sont connues pour extraire plus de Cr que les monocotylédones tels que le blé et l'orge, du fait de la production d'une forte biomasse. Les monocotylédones sont par contre plus tolérantes au Cr et montrent moins de signes de toxicité (Shahandeh et Hossner 2000). Les espèces de *Brassica*, montrent une forte capacité à prélever et à accumuler le Cr en particulier les espèces qui sont connues pour accumuler le soufre comme *Brassica chinensis* (Zayed *et al.* 1998).

Les espèces poussant sur des sols contaminés en Cr (serpentine et chromite) contiennent rarement plus de 100 mg de Cr /kg de MS dans leurs feuilles (Shahandeh et Hossner 2000). Pourtant, quelques plantes hyperaccumulatrices du chrome ont été découvertes, dont *Dicoma niccolefera*, *Pearsonia metallifera*, *Sutera fodina* et *Vetiver zizanioides* (**tableau I.16**). L'accumulation par *Vetiver zizanioides* est sans doute due à son système racinaire prolifique et à sa forte production de biomasse (Dalton *et al.* 1996).

Tableau I.16 : Plantes hyperaccumulatrices de chrome et de mercure.

Hyperaccumulatrices de chrome et de mercure				
Plante	Métaux dans les parties aériennes (mg/kg MS)	Métaux dans les racines (mg/kg MS)	Substrat	Références
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Cr : 7000	—	Sol (500 mg de Cr VI/kg sol)	(Shahandeh and Hossner, 2000)
<i>Azolla caroliniana</i>	HgII : 578 CrIII : 964	—	Hydroponie (10 mg de HgCl <sub>2</sub> , CrCl <sub>3</sub> , 3H <sub>2</sub> O/L)	(Bennicelli <i>et al.</i> , 2004)
<i>Brassica juncea</i>	CrII: 2000-3000 CrVI : 600-650	CrIII : 3000-3300 CrVI : 1800	Sol (2000 mg de CrIII/kg sol ; 500 mg de CrVI/kg sol)	(Han <i>et al.</i> , 2004)
<i>Convolvulus arvensis</i>	CrVI : 4900	CrVI : 15688	Hydroponie (40 mg de Cr VI/L)	(Gardea-Torresdey <i>et al.</i> , 2004)
<i>Dicoma niccolifera</i>	Cr : 1500	—	Sol serpentine	(Wild, 1974)
<i>Glycine max L. Merr</i>	CrIII : 1300	CrIII : 20000	Hydroponie (52 mg de CrIII/L)	(Mei <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pearsonia metallifera</i>	Cr : 20 000	—	Sol serpentine	(Wild, 1974)
<i>Sutera fodina</i>	Cr : 2400	—		(Baker and Brooks, 1989)
<i>Vetiver zizanioides</i>	Cr : 10000	—	Sol (500 mg de Cr VI/kg sol)	(Shahandeh and Hossner, 2000)

### 2.3.3.5. Cas du mercure

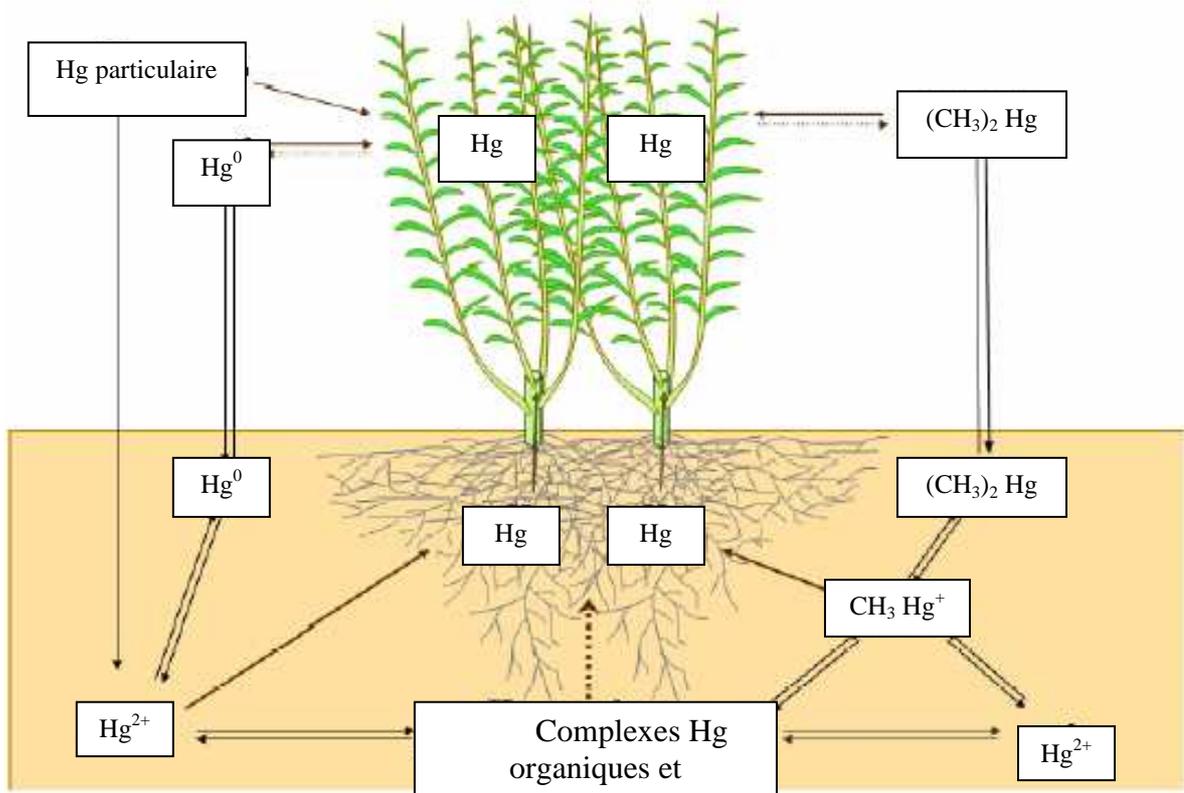
#### Toxicité

Le mercure est l'un des éléments les plus toxiques pour les plantes du fait de sa forte affinité avec les groupements thiols. Les principaux effets de l'action du Hg sont une inhibition de la germination, une inhibition du prélèvement de  $K^+$ , une inhibition de la photosynthèse et par conséquent une diminution de la croissance (Patra *et al.* 2004). Le Hg peut également accélérer la sénescence des plantes en induisant la production d'éthylène (Siegel *et al.* 1984).

#### Absorption racinaire

Les plantes, notamment *Pteris mayii* et *Nicotiana sp.*, peuvent affecter la distribution du Hg dans le sol en mobilisant celui lié aux fractions solubles et échangeables ainsi que les fractions liées aux oxydes (Han *et al.* 2006). Dans les sols à forte teneur en matière organique, le Hg est néanmoins peu disponible car il est sous forme complexée (Ravichandran 2004).

Les plantes peuvent absorber le Hg par les racines et le transloquer vers les feuilles, mais elles peuvent également absorber des vapeurs de Hg par leurs stomates (notamment les aiguilles de pin) (Cavallini *et al.* 1999; Lindberg *et al.* 1991) (**figure 1.16**).



**Figure 1.16 :** Rôle des plantes terrestres dans le cycle biogéochimique de Hg (Wang 2004).

### **Transport et accumulation**

Le Hg semble être transporté assez facilement par diffusion dans les plantes. Le glutathion et les phytochélatines peuvent être responsables de la prise en charge du Hg car l'exposition des plantes à ce métal augmente la quantité de thiols dans la plante (Subhadra *et al.* 1993).

Une étude récente sur l'accumulation du Hg par le saule a montré que la majorité du Hg est accumulée et retenue dans les parois cellulaires des racines et seulement 0,5 à 0,6% est transloquée vers les feuilles (Wang et Greger 2004). D'autres études confirment que le Hg est principalement retenu dans les racines en particulier lorsqu'il est sous forme organique plutôt qu'inorganique (Cavallini *et al.* 1999; Ribeyre et Boudou 1994). Certaines plantes tel que l'orge peuvent volatiliser le Hg en présence d'acide ascorbique (Battke *et al.* 2005).

### **Phytoremédiation**

La plupart des recherches se basent sur l'utilisation de plantes génétiquement modifiées, notamment par l'insertion de gènes bactériens de l'opéron *mer* dans les plantes telles qu'*Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana tabacum* pour volatiliser le Hg.

L'insertion de gènes codant pour la synthèse de la réductase mercurique Mer A augmente jusqu'à 10 fois la résistance de la plante à HgII et augmente également la volatilisation de ce dernier (Henry 2000; Rugh *et al.* 1996). Certains macrophytes sont capables de dégrader le méthylmercure avec le gène *mer B* codant pour la lyase organomercurique et accumulent le HgII produit (Bizily *et al.* 1999).

*Azolla caroliniana* est une petite fougère aquatique qui le plus souvent vit en symbiose avec *Anabaena azollae*, une cyanobactérie. Elle peut absorber des métaux tel que Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn et se révèle être le seul hyperaccumulateur de Hg sans modification génétique, prélevant 75 à 100% du métal présent initialement (Bennicelli *et al.* 2004) (**tableau I.16**).

#### **2.3.3.6. Cas du plomb**

### **Toxicité**

Le Pb affecte le métabolisme global de la plante, notamment la photosynthèse (Fargašová 2001), inhibe l'élongation racinaire (Peng *et al.* 2005) et peut causer des dommages membranaires (Sharma et Dubey 2005). Les effets toxiques du Pb sur les plantes se traduisent par un brunissement des racines dû à une augmentation de la subérisation, une diminution du chevelu racinaire, de la croissance et de la production de biomasse (Piechalak *et al.* 2002). Ces

effets s'expliquent par le fait que le plomb inhibe ou diminue la division cellulaire, induisant une distribution plus compacte des racines latérales (Obroucheva *et al.* 1998). De plus, l'exposition au Pb provoque une détérioration des structures cellulaires en se fixant sur leurs constituants, notamment le plasmalemme, ce qui perturbe la perméabilité de la cellule à l'eau et la balance hydrique de la plante (Sharma et Dubey 2005). Une exposition au Pb perturbe par ailleurs le prélèvement et la translocation d'éléments essentiels à la plante, principalement le Ca mais également le Fe, K, Mg, Mn et Zn (Huang et Cunningham 1996). Une des hypothèses suggérées est que le Pb bloque les canaux à CaII de la membrane plasmique des cellules racinaires ou agit comme ion compétiteur pour les systèmes de transport (Huang et Cunningham 1996).

### **Absorption racinaire**

Le Pb est typiquement non disponible pour les plantes lorsqu'il est complexé avec la matière organique, adsorbé sur les oxydes ou les argiles, précipité sous forme de carbonates ou d'hydroxydes (Athalye *et al.* 1995; Blaylock *et al.* 1997). Lorsque le Pb pénètre dans les racines il est en contact avec de fortes concentrations en phosphates, un pH élevé et des concentrations importantes en carbonate et bicarbonate dans les espaces intracellulaires, ce qui tend à l'immobiliser sur les parois cellulaires (Sharma et Dubey 2005). Le prélèvement de Fe dans les plantes est corrélé négativement au prélèvement du Pb, ce qui laisse supposer une compétition et un transport par les mêmes récepteurs (Fodor *et al.* 1998).

### **Transport et accumulation**

La plupart des études ont montré que le Pb entrait de façon passive dans les racines des plantes puis était dirigé de façon apoplastique vers les vaisseaux conducteurs et les voies de transpiration, le Pb ne pouvant pas être transporté activement de façon symplastique dans les plantes (Clemens *et al.* 2002; Tung et Temple 1996). Il peut ensuite soit précipiter avec des phosphates, migrer dans le xylème ou être échangé avec le phloème (Brennan et Shelley 1999). Une fois dans le xylème, il peut être adsorbé sur la paroi cellulaire, le Pb est alors accumulé dans la tige et les feuilles, rigidifiant ainsi les vaisseaux (Weis et Weis 2004).

Les processus de défense des plantes contre le Pb sont peu connus et résultent d'une inactivation ou d'un évitement de la contamination (Piechalak *et al.* 2002). L'inactivation consiste en une détoxification de Pb dans les racines par les phytochélatines dont la disparition au cours du développement de la plante laisse penser qu'elles ne jouent qu'un rôle transitoire dans la détoxification de Pb (Mehra *et al.* 1995; Piechalak *et al.* 2002).



Tableau I.17: Plantes hyperaccumulatrices de plomb.

Hyperaccumulatrices de plomb				
Plante	Métaux dans les parties aériennes (mg/kg MS)	Métaux dans les racines (mg/kg MS)	Substrat	Références
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	1075	1686	Sol (30000 mg de Pb/kg sol)	(Pichtel <i>et al.</i> , 2000)
<i>Brassica juncea</i>	7000	—	Sol (600 mg de Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> /kg sol)	(Elless et Blaylock 2000)
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern	34500	108300	Sable (500 mg de Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> /L)	(Kumar <i>et al.</i> 1995)
<i>Cichorium intybus</i>	1141	601	Sol (500 mg de Pb /kg sol)	(Del Rio-Celestino <i>et al.</i> 2006)
<i>Festuca ovina</i>	11750	—	—	(Barry et Clark 1978)
<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	4200	—	—	(Tamura <i>et al.</i> 2005)
<i>Hemidesmus indicus</i>	3956	2638	Sol (10000 mg de Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> /kg sol)	(Chandra Sekhar <i>et al.</i> 2005)
<i>Medicago lupulina</i>	1466	1484	Sol (50000 mg de Pb /kg sol)	(Pichtel <i>et al.</i> 2000)
<i>Mullen verbasum</i>	1160	1248	Sol (50000 mg de Pb /kg sol)	(Pichtel <i>et al.</i> 2000)
<i>Pelargonium sp Tango</i>	10955	21095	Perlite (2500 mg de Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> /kg sol)	(Dan 2001)
<i>Sesbania drummondii</i>	10000	—	—	(Sahi <i>et al.</i> 2002)
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	8200	—	—	(Reeves et Brooks 1983)
<i>Taraxacum officinale</i>	1133	1090	Sol (50000 mg de Pb /kg sol)	(Pichtel <i>et al.</i> 2000)
<i>Vicia faba</i>	—	10 000	Hydroponie (250 mg de Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> /L)	(Piechalak <i>et al.</i> 2002)

Le Pb dans les racines s'accumule particulièrement dans l'apex, le chevelu racinaire et les départs de racines secondaires, sous forme chélatée le long des parois cellulaires par des dérivés phosphates, des protéines et des polysaccharides (Tung et Temple 1996). Les racines accumulent en effet 3 à 50 fois plus de Pb que les feuilles, le facteur de translocation étant par conséquent assez faible (Huang et Cunningham 1996), notamment chez les *Brassicaceae* où 90% du Pb est accumulé dans les racines (Kumar *et al.* 1995).

### **Phytoremédiation**

Il existe quelques plantes hyperaccumulatrices du Pb (**tableau I.17**). Les plantes de la famille des *Brassicaceae* sont de bons accumulateurs de Pb, notamment *Brassica juncea* (Blaylock *et al.* 1997; Kumar *et al.* 1995) qui peut accumuler jusqu'à 10000 mg de Pb /kg de MS dans les feuilles et 100000 mg/kg de MS dans les racines au bout de 20 jours de culture soit une élimination de 2300 kg de Pb/ha de sol (Henry 2000).

La plupart du temps, la teneur en Pb dans les plantes n'excède pas 70 mg/kg de MS mais sur certains sites, des herbes contenant plus de 7000 mg/kg de MS de Pb ont été identifiées (Barry et Clark 1978).

De nouvelles plantes hyperaccumulatrices de Pb ont récemment été découvertes : *Hemidesmus indicus*, qui peut éliminer jusqu'à 43% du Pb d'un sol (contenant initialement 1587 mg de Pb/kg de sol sec) (Chandra Sekhar *et al.* 2005) et *Cichorium intybus* qui peut accumuler jusqu'à 1141 mg/kg de MS de Pb dans ses feuilles avec un FB de 2,3 et un FT de 1,9 (Del Rio-Celestino *et al.* 2006).

Le maïs est également un hyperaccumulateur de Pb car il peut accumuler 10600 mg de Pb/kg de MS sur un sol contenant 2500 mg de Pb /kg de MS avec 2 g d'HEDTA<sup>\*</sup>/kg de sol (Huang et Cunningham 1996). Mais le maïs est capable de transloquer le Pb en absence d'EDTA ou de composés dérivés, même si la teneur en Pb dans les racines est faible (Brennan et Shelley 1999). De plus, parmi les espèces classiquement utilisées en phytoremédiation, cette espèce est celle qui accumule le plus de Pb et a le FT le plus élevé, comparativement aux autres espèces testées par Huang et Cunningham (1996) (**tableau I.18**).

Une étude comparative a montré que les peupliers avaient également un potentiel de phytoremédiation élevé du fait de leur forte biomasse et d'une capacité supérieure aux hyperaccumulateurs, tel que *Thlaspi caerulescens*, à mobiliser le Pb dans le sol (Fischerova *et al.* 2006)

---

\* Voir table des abréviations

**Tableau I.18** : Concentration en Pb (mg/kg de MS) et facteur de translocation (FT) dans les feuilles en fonction des différentes espèces (Huang et Cunningham 1996).

Espèces végétales	Concentration en Pb (1)	FT (1)	Concentration en Pb (2)	FT (2)
<i>Zea mays</i>	375	0,164	225	0,180
<i>Brassica juncea</i> (211000)	347	0,024	129	0,054
<i>B. juncea</i> (426308)	329	0,049	*	nd
<i>B. juncea</i> (531268)	241	0,012	97	0,028
<i>T. rotundifolium</i>	226	0,008	79	0,012
<i>B. juncea</i> (175607)	176	0,010	*	nd
<i>Triticuma aestivum</i>	139	0,026	120	0,063
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	95	0,020	75	0,037
<i>B. juncea</i> Cern	65	0,007	45	0,013
<i>T. caerulescens</i>	64	0,002	58	0,012
<i>B. juncea</i> (180269)	59	0,012	*	nd
<i>B. juncea</i> (184290)	32	0,006	30	0,013

\*inhibition de croissance par phytotoxicité de Pb.

nd : non déterminé.

(1) culture en hydroponie avec 4 mg de Pb /L.

(2) culture sur sol avec 2500 mg de Pb /kg.

### 2.3.3.7. Accumulation multimétallique

Aux Etats-Unis, 70% des sites contaminés le sont par au moins 2 métaux (Forstner 1995). La présence de plusieurs métaux peut altérer la bioaccessibilité de chacun d'eux du fait d'une éventuelle compétition pour les sites de fixation sur des particules de sol, des substances humiques et des agents complexants organiques (Kamnev et van der Lelie 2000). Les mécanismes de résistance de la plante et le prélèvement d'un métal particulier peuvent être également affectés par une combinaison de plusieurs métaux.

Bien qu'aucun hyperaccumulateur universel n'ait été découvert, plusieurs plantes sont capables de co-accumuler les métaux : *Aeollanthus biformifolius* (Cu, Co), *Thlaspi rotundifolium* sp *cepaefolium* (Pb, Zn), *T. caerulescens* (Cd, Pb, Zn), *T. goesingense* (Co, Mn, Ni, Zn) (Baker et al. 2000; Baker et al. 1994). Parmi les rares études réalisées sur sites polycontaminés, il a été prouvé que l'utilisation de *Zea mays* et *Brassica napus* pouvait être envisagée pour un sol contaminé en Cd, Cr, Cu, Mn, Pb et Zn (Wang et al. 2002).

### 2.3.4. Phytoextraction assistée chimiquement

Afin de réduire la durée de phytoextraction, des adjuvants ont été testés de façon à augmenter la mobilité des métaux dans le sol et donc la concentration en métaux dans la plante. C'est le cas de composés chimiques tel que l'EDTA et ses dérivés mais également d'autres composés synthétiques plus dégradables que l'EDTA

#### 2.3.4.1. EDTA, EGDA, HEDTA\*

L'addition de chélatants chimiques (EDTA, HEDTA) augmente la concentration en Pb soluble dans les sols ainsi que leur accumulation dans les plantes : jusqu'à 10 000 mg/kg de MS dans les feuilles de *Brassica juncea*, *Zea mays* et *Pisum sativum* (Blaylock *et al.* 1997; Huang *et al.* 1997). Les chélatants (1) augmentent la solubilité des métaux dans le sol, (2) facilitent leur diffusion dans la rhizosphère, (3) augmentent la translocation vers les feuilles.

Complexé à l'EDTA, par exemple, le Pb est plus facilement transloqué vers les feuilles *via* le xylème (Epstein *et al.* 1999; Vassil *et al.* 1998) et le complexe EDTA-métal protège la plante d'une éventuelle toxicité (Ruley *et al.* 2004).

L'ajout d'EDTA augmente également la fraction mobile (fraction soluble et échangeable) du CrIII dans le sol et augmente la concentration en CrIII d'un facteur 2 à 3 dans les racines et les feuilles de *B. juncea*, *H. annuus* et *Zea mays* (Athalye *et al.* 1995; Chen et Cutright 2001; Shahandeh et Hossner 2000). L'EDTA augmente non seulement le prélèvement mais également le facteur de translocation du chrome puisque le complexe n'est pas fixé sur les sites d'échange cationique des parois (Han *et al.* 2004)

L'utilisation de chélatants chimiques est cependant controversée en raison de la plus grande biodisponibilité des métaux et par conséquent d'un risque possible de lixiviation (Jiang *et al.* 2003; Wu *et al.* 2004). Cette mobilité accrue peut se traduire par des effets négatifs mis en évidence sur les microorganismes et les nématodes, notamment avec l'EGDA (Bouwman *et al.* 2005; Romkens *et al.* 2002). D'autres études ont montré impact négatif de l'EDTA sur les activités enzymatiques du sol et sur le nombre total de bactéries (Grčman *et al.* 2001), ainsi que sur le nombre de *Pseudomonas* sp. et des bactéries dénitrifiantes (Galimska-Stypa *et al.* 2000).

L'EDTA peut aussi induire des effets toxiques importants chez les végétaux soit directement, soit indirectement en induisant des stress métalliques chez les plantes ayant accumulé plus de métaux grâce à ce chélatant (Chen et Cutright 2001; Nascimento et Xing 2006; Vassil *et al.* 1998).

---

\* Voir table des abréviations

Enfin, la dégradabilité de l'EDTA est très limitée puisqu'il faut que le complexe EDTA-métal soit clivé. Ces complexes ont été détectés dans le sol cinq mois après application de l'EDTA à un sol contaminé avec du Cd et du Zn (Lombi *et al.* 2001).

Le résultat final suite à l'ajout de chélatants est donc contrasté d'autant plus que l'accumulation dans la plante est variable en fonction de la forme chimique des métaux et des espèces végétales (Wu *et al.* 1999). Lombi *et al.* (2001) ont montré que l'ajout d'EDTA augmente la mobilité de Cd, Cu, Pb et Zn, dans le sol et leur absorption dans les racines de *Zea mays* mais pas dans les feuilles. D'autres études prouvent que l'ajout d'EDTA n'augmente pas, voire réduit le prélèvement de Ni par *Berkheya coddii* (Robinson *et al.* 1997a) malgré une augmentation de la concentration en Ni soluble du sol. La phytoextraction assistée chimiquement peut aussi se révéler inefficace en cas de polycontamination, d'une part du fait d'un possible effet synergique de la toxicité des métaux vis à vis de la plante ; d'autre part de la non sélectivité des chélatants pour les métaux ciblés (Nascimento et Xing 2006). Tel est le cas du Cd, Cu, Pb et Zn qui peuvent être relargués et réadsorbés par les constituants du sol ou migrer vers les couches souterraines au profit de la complexation du Ca, Fe, Mg et Mn (Wu *et al.* 2004).

Un dernier point en défaveur des chélatants est leur coût. Une utilisation en plein champ pour une solubilisation efficace requiert environ 2,5 à 10 mM d'EDTA/kg de sol, soit 0,2 à 0,8 millions d'euros par hectare (Wu *et al.* 1999).

#### 2.3.4.2. Autres composés

De nombreuses études se sont penchées sur des alternatives aux chélatants chimiques pour augmenter la mobilisation des métaux du sol et leur phytoextraction. Une des solutions consiste à réduire le pH du sol, par exemple à l'aide de soufre, mais cette acidification entraîne généralement une diminution de l'activité microbienne (Wang *et al.* 2006).

Des chélatants synthétiques biodégradables (EDDS, MGDA, DTPA<sup>\*</sup>) (Meers *et al.* 2005; Tamura *et al.* 2005) et des chélatants naturels (NTA, acides organiques) ont été étudiés comme alternative à l'EDTA (Quartacci *et al.* 2006; Wenger *et al.* 2003). Leur meilleure dégradabilité, notamment celle du DTPA peut toutefois limiter leur efficacité (Means *et al.* 1980).

Enfin, des études ont montré que des acides organiques (citrique et gallique) pouvaient se montrer aussi efficace que l'EDTA et augmenter en plus la biomasse végétale produite (Nascimento et Xing 2006). L'acide citrique diminue la toxicité de Cr et Pb pour les plantes et augmente le facteur de translocation (Chen *et al.* 2003; Srivastava *et al.* 1999). Cependant ces acides organiques peuvent être dégradés par les microorganismes du sol diminuant ainsi leur

---

\* Voir table des abréviations

effet sur l'absorption des métaux par les plantes en particulier lorsque de petites doses sont appliquées (Romkens *et al.* 2002). Apporté à fortes doses, l'acide citrique peut se révéler toxique pour les plantes (Turgut *et al.* 2004).

L'utilisation de fertilisants permet aussi d'augmenter la quantité totale de métaux extraits, essentiellement grâce aux rendements plus élevés en biomasse. Par exemple, l'application de fertilisants azotés a permis de tripler la biomasse d'*Alyssum bertolonii* en 12 mois mais une légère diminution de la concentration en Ni dans la biomasse a été constatée (Robinson *et al.* 1997b). De même, l'apport d'engrais phosphatés peut provoquer la précipitation de Pb sous forme de Pb-phosphate insoluble (pyromorphite ou chloropyromorphite) malgré l'augmentation de biomasse des végétaux (Chaney *et al.* 2000).

### 2.3.5. Amélioration génétique

Plusieurs stratégies pour améliorer génétiquement les plantes utilisées en phytoremédiation ont été envisagées : l'altération de la spécificité des systèmes de prélèvement des métaux et l'augmentation de la production des substances chélatantes pour augmenter le taux de translocation et la séquestration des métaux (Krämer et Chardonnens 2001).

Les plantes transgéniques qui surexpriment les enzymes impliquées dans la biosynthèse du glutathion, le précurseur des phytochélatines, montrent une plus grande tolérance aux métaux et une accumulation accrue dans leurs feuilles (Gisbert *et al.* 2003). L'introduction de métallothionéines de *Pisum sativum* dans *A. thaliana* a eu pour effet d'augmenter le prélèvement de Cu par les racines (Evans *et al.* 1992). De même des gènes de métallothionéines d'origine animale transférés à *A. thaliana*, *Nicotiana* sp. et *Brassica* sp. ont permis d'augmenter la tolérance des plantes au Cd mais n'a eu aucun effet ou des effets négatifs sur l'accumulation de Cd dans la plante (Karenlampi *et al.* 2000). La synthèse de phytochélatines et de métallothionéines est coûteuse en énergie et en nutriments, notamment en N et en S. Leur surexpression dans des plantes transgéniques pourrait affecter leur croissance et *in fine* leur potentiel de phytoextraction.

Une autre stratégie pourrait consister à favoriser la translocation des métaux en augmentant l'efficacité de transpiration de la plante ou en supprimant les composés qui pourraient bloquer la transpiration, par exemple l'acide abscissique. C'est le cas d'un mutant sélectionné de *B. juncea* qui extrait deux fois plus de Pb que l'écotype sauvage (Gleba *et al.* 1999).

### 2.3.6. Elimination des déchets produits

La phytoremédiation avec des espèces à forte biomasse telle que *B. juncea* peut conduire à une production volumineuse de déchets à traiter : par exemple 6 t/ha contenant 10000 à 15000 mg de Pb par kg de matière sèche (Blaylock *et al.* 1997).

Une des premières étapes est la réduction de volume par compostage ou par compaction (Kumar *et al.* 1995; Raskin *et al.* 1997). Les deux traitements nécessitent toutefois de récupérer les lixiviats. La biomasse est ensuite traitée par différentes techniques, principalement par voie thermochimique (**tableau I.19**) (Ghosh et Singh 2005b). Le produit final peut être stocké, réutilisé en fonderie, ou subir une extraction liquide des métaux dans les cendres, cette dernière technique étant encore au stade expérimental (Cunningham et Berti 2000; Sas-Nowosielska *et al.* 2004).

**Tableau I.19** : Comparatif des coûts de traitement de déchets issus de la phytoremédiation (adapté de Sas-Nowosielska *et al.*, 2004).

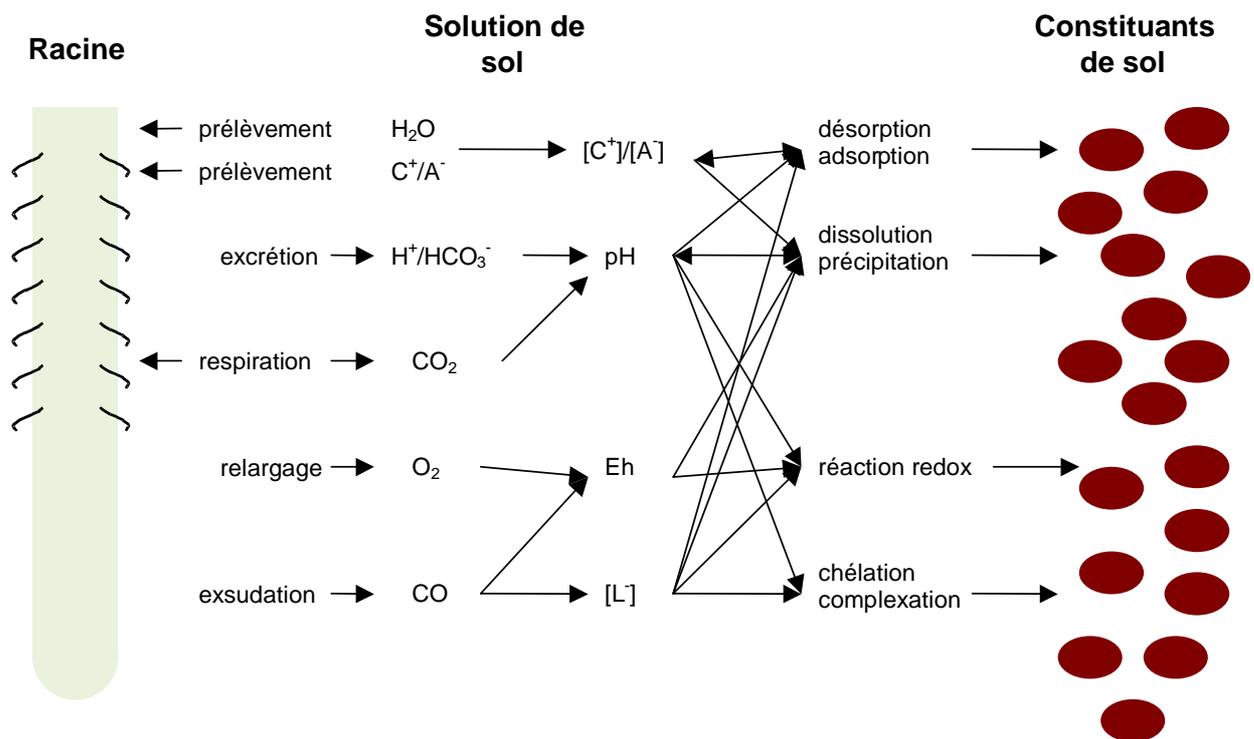
	Technique	Coût du procédé (en €/t)	Avantages	Inconvénients
Prétraitement des déchets	Compostage	10-25	Réduction du volume d'air et d'eau	Durée de traitement (2 à 3 mois) Demande un équipement spécial Le produit final est un déchet dangereux
	Compaction	Non disponible	Réduction de volume Récupération des lixiviats contenant des métaux	Demande un équipement spécial Le produit final est un déchet dangereux (biomasse et lixiviats)
	Pyrolyse	20-30	Réduction significative du volume Produit final utilisable (pyrogaz)	Le produit final est un déchet dangereux Nécessité un séchage préalable des déchets
Traitement de déchets	Incineration	180-220	Récupération des métaux possible Réduction significative de la biomasse (>90%)	Nécessite un traitement des fumées
	Stockage en CET	135-1136	Peu coûteux en temps	Onéreux Limitation de la contenance Redirigé vers l'incinération Ne réduit pas la biomasse
	Extraction liquide	Non disponible	Récupération des métaux	Pas de technologie applicable

### 3. Phytoremédiation couplée à la bioremédiation (ingénierie de la rhizosphère)

#### 3.1. Fonctionnement de la rhizosphère

La rhizosphère est définie comme étant la zone du sol sous l'influence biologique et biochimique des racines. Les exsudats et les sécrétions des racines créent ainsi « l'effet rhizosphère » qui se manifeste le plus souvent par une activité microbienne intense (Bowen *et al.* 1999).

Les facteurs tels que la nature du sol et les paramètres physico-chimiques associés, les propriétés du système racinaire, le statut nutritionnel de la plante et les conditions climatiques peuvent influencer la taille et le fonctionnement de la rhizosphère (Gobran *et al.* 2001). D'autre part les caractéristiques des sols sont en retour modifiées par les plantes du fait de leur croissance, du prélèvement de nutriments ou de contaminants, et par l'exsudation racinaire (**figure 1.17**).



**Figure 1.17** : Schématisation des effets des exsudats racinaires sur les facteurs abiotiques et les mécanismes à l'interface sol-solution. CO : carbone organique (réducteur, chélatant, ligand), C<sup>+</sup> : cation, A<sup>-</sup> : anion, L<sup>-</sup> : ligand, Eh : potentiel redox (d'après Adriano *et al.*, 2004).



### 3.1.1. Interaction bactéries/plantes

Certains organismes ont des relations symbiotiques ou mutualistes avec la plante, c'est à dire une association d'organismes à bénéfice réciproque. Les échanges entre plantes et microorganismes peuvent être basés sur l'apport d'eau et de nutriments à la plante en échange de substances carbonées, et d'une protection physique pour les microorganismes. Trois types de microorganismes sont impliqués :

- **Les ectosymbiontes** : ce sont des microorganismes qui restent à l'extérieur de la racine soit dans la rhizosphère (sol environnant les racines) ou dans le rhizoplan (surface des racines). C'est le cas des bactéries *Pseudomonas*, *Azospirillum* et *Paenibacillus* et de champignons tel que *Trichoderma* ;
- **Les mésosymbiontes** : ce sont les champignons ectomycorhiziens, dont les Ascomycètes, Basidiomycètes. Certains champignons de type *Laccaria* ont un grand intérêt en sylviculture et forment un réseau mycélien qui pénètre entre les cellules des plantes ;
- **Les endosymbiontes** : ce sont les champignons endomycorhiziens dont les hyphes pénètrent dans les cellules végétales jusqu'au plasmalemme en formant des arbuscules. Ces champignons sont dit **AMF** (arbuscular mycorrhizal fungi) et appartiennent majoritairement à la famille des *Glomales*. Le niveau suivant est dit endosymbiose intracellulaire lorsque l'organisme parvient à percer le plasmalemme. C'est le cas de *Rhizobium* et de *Frankia* qui forment des nodosités avec les légumineuses.

#### **Les AMF (arbuscular mycorrhizal fungi)**

Les AMF sont présents dans la plupart des sols et colonisent 97% des espèces végétales (Abbott et Robson 1991). L'association racine-AMF améliore la croissance de la plante cultivée sur un sol non fertile par augmentation de la surface d'échange racinaire (Smith 1997) et par conséquent accroît la mobilisation de nutriments essentiels notamment le P (Marschner et Dell 1994; Smith 1997). Les AMF tel que *Glomus* augmentent le poids sec, la surface racinaire et la longueur des racines de *Zea mays* par rapport aux plantes non mycorrhizées (Clark et Zeto 1996). La colonisation racinaire par les AMF peut affecter les rhizobactéries de façon directe (apport de sources carbonées, variations de pH, présence de composés fongiques stimulateurs ou inhibiteurs, compétition pour les nutriments) ou indirecte (effet sur la plante hôte, l'exsudation ou la structure du sol) (Johansson *et al.* 2004).

#### **Rhizobactéries**

Les bactéries associées aux racines peuvent agir fortement sur la nutrition de la plante grâce à de nombreux mécanismes impliqués dans les relations mutualistes ; tel est le cas des

PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). On recense de nombreux genres dont *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes* (*Ralstonia*), *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Serratia* (Höflich *et al.* 1994; O'Sullivan et O'Gara 1992).

Les PGPR agissent sur la croissance et le développement du végétal à deux niveaux : (1) **par voie indirecte**, par réduction du nombre des phytopathogènes ou en prévention de leur développement ; (2) **par voie directe**, par l'augmentation de la biomasse végétale et du prélèvement des nutriments grâce à la production d'hormones de croissance végétale (auxine, acide indole acétique, gibbérelline, ou cytokinine), la solubilisation du phosphore, la production de sidérophores, d'enzymes spécifiques ou la fixation de l'azote atmosphérique (Glick 1999; Kloepper 2003). Par exemple, l'inoculation du sol avec *P. fluorescens* PsIA12 permet d'augmenter à la fois la croissance de *Zea mays* et sa teneur en macroéléments (N, P, K) (Egamberdiyeva *et al.* 2002). Le potentiel élevé de colonisation racinaire par les PGPR s'explique par leur capacité à survivre dans la rhizosphère, à être compétitifs pour l'utilisation des nutriments exsudés par la plante et à être présents en nombre suffisant grâce à une colonisation efficace (Lugtenberg 1999).

Les microorganismes rhizosphériques sont en majorité des bacilles Gram<sup>-</sup> dont les *Pseudomonas* (Kuiper *et al.* 2004). Les *Pseudomonas* sont capables de coloniser le rhizoplan\* et l'endorhizosphère\* du maïs (Benizri *et al.* 1997). L'utilisation des *Pseudomonas* fluorescents (PF) s'est largement développée en biocontrôle des agents pathogènes, grâce à la production d'antibiotiques, d'acide cyanhydrique et de sidérophores (Bloemberg et Lugtenberg 2001).

### 3.1.2. Rôle des facteurs biotiques et abiotiques impliqués dans la colonisation racinaire et la rhizocompétence

La colonisation microbienne des plantes est affectée par des facteurs biotiques et abiotiques tels que la compétition, l'exsudation racinaire, la disponibilité des nutriments inorganiques, le pH et la température du sol (van Veen *et al.* 1997).

#### **Rôle du sol et des conditions de culture**

Latour *et al.*, 1996 ont montré que la composition du sol était le facteur dominant responsable de la diversité des populations bactériennes associées aux racines (en particulier les PF). Par exemple, les populations bactériennes de différents cultivars de maïs ne présentent pas de différences significatives contrairement aux différents sols testés (Chiarini *et al.* 1998). Les

---

\* Voir glossaire

réponses variées des plantes, par ailleurs non corrélées à la colonisation par des PGPR, s'expliquent principalement par les variations de température, d'humidité, de pH et d'intensité lumineuse (Kuiper *et al.* 2004).

### **Facteurs liés au végétal**

Les facteurs régissant la rhizocolonisation des plantes sont l'espèce végétale et son état physiologique, facteurs qui conditionnent la qualité et la quantité de la rhizodéposition. La rhizodéposition décrit le transfert du carbone total des racines des plantes vers le sol et comprend les exsudats racinaires, les sécrétions enzymatiques, les lysats des cellules mortes et les mucilages (Grayston *et al.* 1997). La diversité de groupes microbiens qui interagissent directement avec les racines des plantes est plus affectée par la diversité végétale et les espèces végétales que les groupes microbiens avec moins d'interaction racinaire (par exemple les bactéries nitrifiantes) (Kowalchuk *et al.* 2002).

Les exsudats racinaires se caractérisent par un mélange complexe d'acides organiques, de phytosidérophores, de sucres, de vitamines, d'acides aminés, d'ions inorganiques (ex :  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}^+$ ), de gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ) qui ont un effet direct ou indirect sur l'acquisition des nutriments par la plante et les microorganismes environnants (Dakora et Phillips 2002). La composition des populations microbiennes dépend de la composition des exsudats racinaires ainsi que du type de racine, de l'âge de la plante et du type de sol (Chiarini *et al.* 1998; Yang et Crowley 2000).

Certaines plantes agissent spécifiquement sur certaines bactéries en libérant par leurs exsudats des nutriments médiateurs aux propriétés chimiotactiques. Par exemple, de nombreuses bactéries se multiplient dans la rhizosphère en réponse à la libération de flavonoïdes; et stimulent en retour l'exsudation de flavonoïdes dans la rhizosphère (Hartwig *et al.* 1991; Recourt *et al.* 1991). Certains gènes bactériens peuvent aussi être activés par des exsudats spécifiques : ainsi, un promoteur fort, spécifiquement induit par la proline présente dans la rhizosphère des graminées, a été identifié chez *P. fluorescens* (van Overbeek et van Elsas 1995). Fray *et al.* (1999) ont également montré que les hormones végétales de type AHL (acyl homosérines lactones) permettaient la communication entre plante hôte et bactéries.

### **Facteurs liés aux rhizobactéries**

Un des facteurs essentiels pour l'efficacité de la colonisation racinaire par les bactéries est leur **rhizocompétence**. Cette propriété se traduit chez les populations de PF rhizosphériques par leur capacité à (1) mobiliser le fer ferrique (2) à réduire les nitrates et à dénitrifier, et (3) à utiliser des sources carbonées et d'énergie spécifiques tels que des sucres (saccharose, tréhalose, xylose), des polyols (inositol, sorbitol) et des acides aminés (citrulline, trigonelline) (Curl et Truelove 1986; Latour *et al.* 2003). La vitesse de croissance est également un facteur important

de la colonisation : plusieurs études sur la rhizosphère du blé et du maïs ont montré que les bactéries à stratégie r (croissance rapide) étaient prédominantes dans les racines immatures alors que celles à stratégie k (croissance lente) prédominaient dans les racines plus matures (De Leij *et al.* 1995; Nacamulli *et al.* 1997). Certaines bactéries ont la capacité de varier phénotypiquement tout en conservant l'intégrité de leur génome, ce qui leur confère une meilleure aptitude à coloniser les racines et à protéger la plante contre d'éventuels phytopathogènes. L'étude de van den Broek *et al.* (2003) montre que 93% des souches de *Pseudomonas* antagonistes, isolées à partir des racines du maïs, peuvent varier phénotypiquement. Tel est aussi le cas de *P. brassicacearum* dont la variation de phase constitue une stratégie de colonisation de rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana* (Achouak *et al.* 2004).

La capacité de production de chélateurs du Fe tels que les sidérophores constitue un avantage compétitif pour la rhizocolonisation. Certaines bactéries possèdent de plus la faculté de récupérer les sidérophores d'autres bactéries pour leur propre besoin en Fe. Des mutants de *Pseudomonas* fluorescents déficients en Pvd se sont en effet révélés être capables d'utiliser une Pvd de la souche sauvage et cinq Pvd d'autres souches mais avec un rendement plus faible malgré la similarité de leurs récepteurs membranaires (Mirleau *et al.* 2000). Les analyses statistiques montrent ainsi que les populations rhizosphériques les plus compétitives appartiennent au même sidérotipe\* (Latour *et al.* 2003).

L'efficacité de la colonisation racinaire est également due à la capacité d'adhésion des bactéries aux racines grâce à la production de composés divers tels que les protéines membranaires, les lipopolysaccharides, l'agglutinine, et les exopolysaccharides (Amellal *et al.* 1999). *B. subtilis*, employé comme agent de biocontrôle, bien que naturellement peu présent dans la rhizosphère, est néanmoins capable de coloniser les racines des plantes grâce à la production de biofilms constitués de surfactine (Bais *et al.* 2004).

La rhizo-compétence des bactéries est également liée au phénomène de quorum sensing. Celui-ci est basé sur la communication entre cellules bactériennes par des molécules signal de type homosérines lactones (van Veen *et al.* 1997).

### **Facteurs liés à l'inoculation**

L'enrobage de graines avec des bactéries est un moyen courant d'inoculer une plante. Pour être efficace, l'inoculum doit convenir à la rhizosphère et à la plante, car l'efficacité de la colonisation varie grandement selon le couple bactérie/plante utilisé. Une étude utilisant des graines de maïs enrobées avec 1% de cellulose de carboxyméthyle contenant *P. fluorescens*

---

\* Voir glossaire

montre que la bactérie colonise préférentiellement les zones apicales et basales de la plante mais peu les zones intermédiaires (Araujo *et al.* 1994). La colonisation racinaire est ainsi le plus souvent le facteur limitant le succès d'une opération de bioaugmentation (Weller 1994).

### 3.2. Ingénierie de la rhizosphère appliquée à la phytoextraction : rhizoremediation

De nouvelles techniques sont requises pour améliorer l'efficacité de la phytoextraction, notamment celles qui associent la phytoextraction à la bioaugmentation pour mobiliser les métaux du sol et augmenter ainsi leur transfert vers les plantes (Guo *et al.* 1996). Parmi ces microorganismes, les PGPR et les AMF sont particulièrement intéressants (Glick 1995; Weller 1994).

La combinaison de deux procédés de dépollution, la phytoremédiation et la bioaugmentation, a donné naissance à une nouvelle technologie : la **rhizoremédiation** (Kuiper *et al.* 2004). Cette technique a été largement développée pour la remédiation de sols contaminés par des polluants organiques (Barac *et al.* 2004; van Aken *et al.* 2004). Bien que de nombreuses bactéries soient résistantes aux métaux et jouent un rôle important dans la mobilisation ou l'immobilisation de ces métaux, peu d'études ont porté jusqu'à présent sur l'interaction des rhizobactéries avec les plantes accumulatrices que ce soit sur leur rôle dans la tolérance aux métaux ou sur le niveau de prélèvement de ces métaux (Glick 2003).

#### 3.2.1. Microorganismes symbiotiques

La présence d'AMF a été observée dans la rhizosphère de plantes poussant sur sols contaminés par des métaux lourds, suggérant un avantage sélectif pour ces plantes en tant qu'espèces pionnières (Khan *et al.* 2000). Dans la majorité des cas, les AMF tendent à réduire le prélèvement des métaux par les plantes non accumulatrices (Joner et Leyval 2001). Dans le cas du Cu, les AMF ont un rôle de protection au niveau des racines et augmentent ainsi la tolérance de la plante au métal (Galli *et al.* 1995).

Dans d'autres cas, les AMF facilitent l'absorption des métaux, par exemple du Cd dans le haricot et le maïs (Guo *et al.* 1996), dans la luzerne (El-Kherbawy *et al.* 1989), le trèfle (Joner et Leyval 1997) et le soja (Heggo *et al.* 1990) selon les conditions de pH et la nature du sol. L'inoculation avec *Glomus intraradices* influence l'accumulation de Pb dans les plantes et la translocation vers les feuilles mais les effets diffèrent selon les espèces et la localisation dans le végétal : la mycorhization réduit la teneur en Pb dans les racines et les feuilles de *Zea mays* mais l'augmente dans les racines d'*Agrostis* (Malcova *et al.* 2003).

Ces résultats contrastés ont plusieurs origines : la nature et la concentration en métaux, les propriétés physico-chimiques du sol, le type d'association AMF/plante hôte, les conditions de pré-culture des microorganismes et la densité racinaire (Leyval *et al.* 1997). Bien que la tendance soit à la réduction du prélèvement des métaux par la plante en présence d'AMF, un couplage adapté hôte/champignon et/ou mis en œuvre dans des conditions favorables pourrait améliorer les performances de phytoextraction (Wilkins 1991). Cependant, les plantes hyperaccumulatrices de la famille des *Brassicaceae* (*B. juncea*, *T. caerulescens*) sont typiquement des plantes non mycorhizées sans association possible avec les AMF (Brown 1994; Kumar *et al.* 1995).

### 3.2.2. Microorganismes non symbiotiques

Plusieurs études ont révélé que les PGPR étaient potentiellement intéressantes pour augmenter la capacité de phytoextraction des métaux (**tableau I.20**) (Carlot *et al.* 2002). Par exemple, l'inoculation de *Pseudomonas*, notamment *P. fluorescens*, stimule la croissance du maïs et le prélèvement de métaux (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) sur des sols faiblement pollués (Höflich et Metz 1997). Les PGPR peuvent ainsi agir sur le prélèvement des métaux par la plante sur plusieurs plans :

- en augmentant le taux de croissance de la plante et dans certains cas l'accumulation des métaux par la plante, par la solubilisation de P et K, et la production de différents métabolites :l'acide indole-3-acétique (IAA), l'ACC déaminase et les sidérophores (Glick 2003).
- en agissant sur la mobilité des métaux dans le sol et par conséquent sur leur absorption par la plante, par le biais des sidérophores et des acides organiques

#### **Solubilisation de P et K**

La présence de métaux notamment Ni et Pb tend à diminuer la quantité de P du sol disponible pour la plante ce qui affecte sa croissance (Halstead *et al.* 1969). L'action conjuguée de la solubilisation du phosphore par des bactéries et de la diminution du pH peut éviter cette carence et en même temps favoriser l'extraction des métaux par la plante. Certaines rhizobactéries solubilisatrices de phosphore peuvent augmenter la concentration en Ni dans les feuilles d'*Alyssum murale* jusqu'à 32% (Abou-Shanab *et al.* 2003). De même, les bactéries solubilisatrices de K et P ( du genre *Bacillus*) permettent d'augmenter la résistance de *Brassica juncea* à Pb et Zn, bien que leur prélèvement par la plante ne soit pas accru (Wu *et al.* 2006).

**Tableau I.20 :** Exemples de cas de rhizoremédiation par bioaugmentation avec des microorganismes non symbiotiques.

Plante hôte	Inoculum	Conditions de culture	Effet de l'inoculation sur la phytoextraction	Références
<i>Alyssum murale</i>	<i>Acidovorax</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhizobium</i>	Sol serpentine (930 mg Ni/kg sol sec)	Augmente jusqu'à 39% la teneur en Ni dans les feuilles d' <i>A. murale</i> par rapport au sol non inoculé. Pas d'effet sur la biomasse produite	(Abou-Shanab <i>et al.</i> 2006)
<i>Brassica juncea</i>	<i>Bacillus subtilis</i> SJ-101	Sol contaminé avec NiCl <sub>2</sub> (1750 mg/kg sol sec)	Augmentation de 77% du prélèvement de Ni dans les feuilles.	(Zaidi <i>et al.</i> 2006)
<i>Brassica juncea</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. PsA4 <i>Bacillus</i> sp. Ba32	Sol contaminé avec 50 à 150 mg de K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> /L	Pas d'effet sur l'accumulation de CrVI dans les racines ou les feuilles	(Rajkumar <i>et al.</i> 2006)
<i>Brassica juncea</i>	Inoculum mixte de <i>Azotobacter chroococcum</i> HKN-5 <i>Bacillus megaterium</i> HKP-1 <i>Bacillus mucilaginosus</i> HKK-1	Sol contaminé (1084 mg de Zn/kg sol sec et 404 mg de Pb/kg sol sec)	Augmente la quantité de métaux extraite par les feuilles de 38% pour le Zn et 92% pour le Pb .	(Wu <i>et al.</i> 2006)
<i>Brassica juncea</i>	<i>Sinorhizobium</i> sp. Pb002	Sol contaminé (465 mg de Pb/kg sol sec)	Diminue le prélèvement de Pb par la plante	(Di Gregorio <i>et al.</i> 2006)
<i>Brassica juncea</i> , <i>Brassica napus</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i> SUD165 <i>K. ascorbata</i> SUD165/26	Sol contaminé (6886 mg de Ni/kg sol, 960 mg de Pb/kg sol sec et 5860 mg de Zn/kg sol sec)	Pas d'effet sur le prélèvement de Ni, Pb ou Zn par la plante.	(Burd <i>et al.</i> 2000)

### **Producteurs d'IAA**

L'IAA est une phytohormone, qui en petite quantité régule les processus intracellulaires et modifie la physiologie des plantes. Certaines hormones végétales comme l'IAA, induisent une activation des ATPases de la membrane plasmique, augmentent la division cellulaire et l'élongation des coléoptiles (tissus protégeant l'apex et les premières feuilles) (Pazurkiewicz-Kocot *et al.* 2003).

Dans une culture hydroponique l'ajout simultané d'IAA (0,1 mM) et d'EDTA (0,2 mM) a augmenté par 28 l'absorption de Pb dans les feuilles de *Medicago sativa* contre 6 avec l'EDTA seul (0,2 mM) (Lopez *et al.* 2005). Dans une autre étude, *Bacillus subtilis* SJ-101 qui produit de l'IAA a permis d'augmenter la croissance de *B. juncea* dans un sol contaminé en augmentant sa tolérance vis à vis des métaux et a multiplié par 1,5 l'accumulation foliaire de Ni (Zaidi *et al.* 2006).

### **Producteurs d'ACC déaminase**

L'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) déaminase assure la dégradation de l'ACC, précurseur de l'éthylène produit par les plantes en état de stress, en ammoniacque et  $\alpha$ -kétobutyrate (Glick *et al.* 1998). Une partie de cet ACC est exsudé par les racines de plantes et peut être dégradée par les bactéries produisant l'ACC déaminase (Glick 2003). Le rôle de l'éthylène est important lors de la première phase de croissance mais peut en effet inhiber l'élongation racinaire en cas de stress (Deikman 1997).

La colonisation des racines de *B. juncea* ou de *B. campestris* par la souche PGPR *Kluyvera ascorbata* SUD165 qui produit l'ACC déaminase, protège les plantes contre la toxicité du Ni, Pb et Zn et contre le stress à l'éthylène (Burd *et al.* 1998). De même l'inoculation de *Brassica napus* avec une PGPR résistante aux métaux et produisant l'ACC déaminase stimule la croissance des plantes sur un sol contaminé au Cd, mais n'augmente pas le prélèvement de Cd par la plante (Belimov 2001). Une autre étude a montré que des plants de tomates génétiquement modifiés, exprimant le gène bactérien de l'ACC déaminase, accumulaient plus de Cd, Co, Cu, Mg, Ni, Pb, et Zn que les plants sans ACC déaminase (Grichko *et al.* 2000).

### **Producteurs de sidérophores**

La contamination par les métaux lourds est souvent associée à un déficit en Fe et au stress à l'éthylène dans la plante (Glick 2003). La conséquence de cette carence se traduit par des chloroses car le déficit en Fe inhibe le développement des chloroplastes et la synthèse de la chlorophylle (Imsande 1998). Les sidérophores bactériens peuvent alors servir de réserve en Fe pour la plante, bien que ses besoins ( $10^{-9}$  M) soient réduits par rapport à ceux des microorganismes ( $10^{-6}$  M) (Bar-Ness *et al.* 1992).



Tableau I.20 (suite)

Plante hôte	Inoculum	Conditions de culture	Effet de l'inoculation sur la phytoextraction	Références
<i>Elsoltzia splendens</i>	Inoculum mixte AMF et <i>Penicillium</i>	Sol contaminé (280 mg Cu/kg sol sec, 7 mg Cd/kg sol sec, 423 mg Pb/kg sol sec, 1715 mg Zn/kg sol sec)	Augmente les teneurs dans les feuilles de : Cu (+20%), Pb (+15%) et Zn (+18%) Diminue ces concentrations dans les racines. Augmente la biomasse totale de 30%.	(Wang <i>et al.</i> 2007)
<i>Prosopis juliflora</i> L.	<i>Rhizobium</i> PJ-1	Sol contaminé (23 mg de Cr/kg sol sec, 24 mg de Cu/kg sol sec, 82 mg de Zn/kg sol sec)	Augmente le prélèvement en métaux dans les feuilles de 133% pour Cr, 42% pour Cu et 14% pour Zn	(Rai <i>et al.</i> 2004)
<i>Scirpus robustus</i>	Mélange de rhizobactéries	Hydroponie avec 1,0 mg de Hg/L et 1,6 mg de Se/L	Augmente de 40-60% l'accumulation de Se dans les feuilles et jusqu'à 65% l'accumulation de Hg dans les feuilles.	(de Souza <i>et al.</i> 1999)
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Inoculum mixte : <i>Microbacterium saperdae</i> , <i>Pseudomonas montelii</i> , et <i>Enterobacter cancerogenes</i>	Sol contaminé (179 mg Zn/kg sol sec)	Multiplie par 2 la concentration en Zn dans les feuilles par rapport au sol non inoculé	(Whiting <i>et al.</i> 2001a)
<i>Trifolium repens</i>	Inoculum mixte : <i>Brevibacillus</i> sp. et AMF	Sol contaminé (270 mg Cd/kg sol sec)	Augmente de 70% la concentration en Cd dans les feuilles	(Vivas <i>et al.</i> 2003)
<i>Zea mays</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., AMF	Sol faiblement contaminé (4,9 mg Cd/kg sol sec, 67,6 mg Cu/kg sol sec, 108 mg Pb/kg sol sec)	L'inoculation avec les <i>Pseudomonas</i> augmente de 71% le prélèvement de Cd et de 56% celui de Cu par les feuilles. L'inoculation mixte de <i>Pseudomonas</i> et d'AMF augmente de 58%, 36% et 27% le prélèvement de Cd, Cu et Pb respectivement, par les feuilles.	(Höflich et Metz 1997)

Le rôle des sidérophores bactériens dans la rhizosphère des plantes poussant sur des sols métallifères n'a pas été clairement élucidé. La chélation des métaux par les sidérophores peut augmenter la phytodisponibilité des métaux en cas de déficience en Fe (Bar-Ness *et al.* 1992). Les sidérophores, essentiellement présents dans la rhizosphère, n'augmentent pas seulement la solubilité du Fe<sup>III</sup> en le désorbant des phases solides mais également celle d'ions métalliques divalents (Awad et Romheld 2000; Carrillo-Castaneda *et al.* 2005). Par ailleurs, la présence de métaux dans le sol stimule en retour la production de sidérophores (Leong 1986).

Il a été prouvé que les sidérophores bactériens pouvaient être utilisés par les plantes : le concombre (*Cucumis sativa*) peut utiliser la FOB (ferroxiamine B), un sidérophore de type hydroxamate, pour restaurer sa synthèse chlorophyllienne dans un milieu carencé en Fe, ce qui a pour conséquence de stimuler la production de biomasse. Le complexe Fe-FOB est utilisé préférentiellement au Fe-EDTA ou aux phytosidérophores et est rapidement transloqué vers les zones à croissance rapide carencées en Fe (Wang *et al.* 1993). Des conclusions identiques ont été présentées par Cline *et al.* (1984) lors d'une étude sur le prélèvement d'hydroxamates par le tournesol et le sorgho. De même, des sidérophores produits par des *Pseudomonas* fluorescents peuvent être impliqués dans le prélèvement de Fe par les tomates (Duss 1986), les œillets, l'avoine (Duijff 1991), la vigne et le maïs (Sharma et Johri 2003a; Sharma et Johri 2003b) et enfin l'arachide, accompagné d'une disparition du phénomène de chlorose (Jurkevitch 1988).

Relativement peu d'études se sont intéressées à l'augmentation du prélèvement de métaux en inoculant le sol avec des microorganismes producteurs de sidérophores. Dubbin et Ander (2003) ont émis l'hypothèse que les sidérophores de type FOB, largement répandus dans le sol pouvaient jouer un rôle dans l'accumulation de Pb par les plantes. Une autre étude a montré qu'un inoculum mixte de bactéries, inoculées dans un substrat artificiel à base de sable a permis de multiplier par 2 à la fois le prélèvement de Zn par *T. caerulea* et la biomasse végétale (Whiting *et al.* 2001a). Une des hypothèses émises par les auteurs est que cette augmentation est due à la production de substances chélatantes métallobactériennes, de type sidérophore par *Pseudomonas* et *Enterobacter*.

### 3.2.3. Efficacité des co-cultures végétales et/ou de co-inoculations de microorganismes

Le rendement de phytoextraction peut être amélioré en cultivant simultanément des espèces mycorhizées et non mycorhizées, des plantes accumulatrices et non accumulatrices ou en bioaugmentant le sol avec un inoculum mixte, comme le montrent de récentes études.

Wu *et al.* (2004b) ont démontré qu'une co-culture de *Zea mays* et de *Brassica juncea* augmentait le rendement de phytoextraction en particulier en les inoculant avec des AMF et des bactéries rhizosphériques. Wu *et al.* (2004c) ont également observé une absorption plus importante du Zn dans deux hyperaccumulateurs *Thlaspi caerulescens* et *Sedum alfredii*, en présence de maïs. Ce système de co-culture entre hyperaccumulateurs non mycorhizés et plantes mycorhizées est ainsi une perspective intéressante pour augmenter le rendement de phytoextraction.

La biomasse d'une plante non accumulatrice, *T. arvense* augmente de 30% lorsque ses racines sont proches de celles de l'hyperaccumulatrice *T. caerulescens* pour le traitement de Zn (Whiting *et al.* 2001b). Cette augmentation est liée à une réduction du prélèvement et de la phytotoxicité de Zn pour *T. arvense*. La forte accumulation de Zn par *T. caerulescens*, qui joue le rôle de phytoprotecteur, conduit à l'augmentation de l'établissement et du développement d'espèces moins résistantes aux métaux. De plus la co-culture de *T. arvense* et *T. caerulescens*, augmente la biomasse de l'espèce hyperaccumulatrice de Zn (*T. caerulescens*), augmente également la concentration en Zn dans les feuilles de *T. caerulescens* de 11% et multiplie par 1,5 la quantité de Zn extraite par la plante par rapport à une monoculture de *T. caerulescens* (Whiting *et al.* 2001b).

Enfin, un inoculum mixte de *Penicillium* et d'AMF a permis d'augmenter de 30% la biomasse produite par *Elsholtzia splendens* et de 15% la teneur en Pb dans les feuilles, tout en réduisant de 10% la teneur en Pb dans les racines (Wang *et al.* 2007).

---

# PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

---

**Tableau II.1** : Récapitulatif des caractéristiques des sols A et B.

	<b>Sol A</b>	<b>Sol B</b>
<b>Type de sol</b>	Limon sablo-argileux	Limon argilo-sableux
<b>Granulométrie</b>		
% argile	17,9	25,2
% limons fins	19,7	29,6
% limons grossiers	14,6	10,5
% sables fins	14,2	8,0
% sables grossiers	27,2	17,5
<b>Analyses chimiques</b>		
Matière organique (g/kg sol)	44,6	63,7
Carbone organique (g/kg sol)	25,8	36,8
Azote total (g/kg sol)	2,78	3,67
Rapport C/N	9,3	10,0
pH eau	7,2	6,4
pH KCl	5,9	5,4
Eh (mV)	270	336
CEC (pH 7) (mé/kg sol)	156	214
Taux de saturation	Saturé > 80%	78 %
Phosphore assimilable Joret- Hebert ( g P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg sol)	0,49	0,2
<b>Cations échangeables</b>		
Potassium (g K <sub>2</sub> O/kg sol)	0,14 (3,0)	0,35 (7,4)
Magnésium (g MgO/kg sol)	0,13 (6,4)	0,15 (7,4)
Calcium (g CaO/kg sol)	4,89 (175)	4,18 (149)
Sodium (g Na <sub>2</sub> O/kg sol)	0,05 (1,5)	0,08 (2,5)

**Remarque** : pour les cations échangeables, les valeurs entre parenthèses sont données en mé/kg de sol sec.

## 1. Description du site d'étude

### 1.1. Prélèvement des échantillons et pré-traitement

Les sols utilisés pour cette étude ont été prélevés sur deux parcelles agricoles de la vallée de la Thur (Haut-Rhin), et sont désignés par A et B (voir leur caractéristiques physico-chimiques dans le tableau **II.1** et en **annexe 1**).

Il s'agit de sols bruns acides alluvionnaires, le sol A est un limon sablo-argileux et le sol B, un limon argilo-sableux. Les teneurs en matière organique des sols A et B sont respectivement 2 à 3 fois supérieures à celles considérées comme optimales pour les sols agricoles, c'est à dire 20g/kg (**annexe 1**).

Des échantillons de la parcelle d'où est issu le sol B, ont été prélevés tous les 100 m ( $S_1$  à  $S_6$ ) sur un transect entre la rivière (la Thur) et un canal usinier. Les prélèvements ont été effectués sur une profondeur maximale de 30 cm correspondant à l'horizon labouré, après avoir décapé la surface. Des échantillons de sédiments ont également été prélevés dans le canal usinier ( $Sed_B$  au bord du canal et  $Sed_M$  au milieu).

Des échantillons de lait et d'ensilage ont été prélevés et analysés de façon à évaluer le risque de transfert vers la chaîne alimentaire, l'ensilage étant destiné à l'alimentation des vaches laitières de l'exploitation.

Des échantillons de plants de maïs poussant sur la parcelle où a été prélevé le sol B, ont été récoltés au stade 6-8 feuilles (correspondant à 5 semaines de croissance) et au stade récolte (correspondant à 15 semaines de croissance), pour une analyse des teneurs en métaux dans les feuilles et les racines.

Tous les sols utilisés dans cette étude ont ensuite été triés pour éliminer les débris végétaux et les cailloux, homogénéisés et tamisés à 2 mm

Les échantillons de sol destinés aux analyses microbiologiques ont été conservés humides, à 4°C, 1 mois au plus avant analyse.

Les échantillons de sol utilisés pour les analyses physico-chimiques ont été séchés à 25°C pendant 1 semaine puis conservés dans des tubes en polypropylène (PP) stériles à -20°C avant analyse. Les échantillons destinés aux analyses de métaux totaux et aux extractions séquentielles (excepté pour le mercure) ont été finement broyés et tamisés de façon à obtenir une granulométrie inférieure à 250µm selon la norme NF ISO 11464 (AFNOR 2006). Pour l'analyse de la spéciation du mercure et de CrVI dans le sol, les échantillons ont été conservés humides à -20°C, sans broyage ni tamisage. Les teneurs totales en métaux des sols A et B ainsi que la concentration en métaux dans les fractions bioaccessibles du sol (F1 et F2) ont été analysées comme décrit aux paragraphes 1.2.5 à 1.2.8.

## 1.2. Méthodes analytiques

### 1.2.1. Détermination du pH eau et pH KCl

La méthode utilisée est celle indiquée dans la norme NF ISO 10390 (AFNOR 1994b). La prise d'essai est d'au moins 5 g de sol sec auxquels est ajouté 5 fois son volume soit en eau distillée ayant une conductivité inférieure ou égale à 0,2 mS/m à 25°C et un pH supérieur à 5,6 ; soit une solution de KCl à 1M. Les tubes sont agités énergiquement à 400 tpm pendant 5 min sur une table d'agitation à température ambiante, et la suspension est mise à reposer au moins 4 h. Le mélange est agité énergiquement avant la mesure du pH qui est mesuré avec un pH-mètre Hanna Instruments 221.

### 1.2.2. Détermination du potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel d'oxydoréduction (Eh) est déterminé d'après le bulletin d'application N° 71/2e de la société Metrohm. Il n'existe pas encore, à l'heure actuelle, de méthode normalisée pour déterminer le Eh dans un sol en conditions de laboratoire. Un échantillon de 25 g de sol sec est introduit dans un flacon en PP de 125 mL, puis 50 mL d'eau distillée sont ajoutés, le tout est agité fortement pendant 5 min à 450 tpm. Le flacon est ensuite agité 2 h à 150 tpm pour éviter que la suspension ne sédimente. Le Eh est mesuré avec le pH-mètre Hanna Instruments 221 tout en maintenant une agitation constante dans le flacon. L'équilibre est atteint après 5 à 10 min.

### 1.2.3. Détermination de l'humidité résiduelle et du poids sec

Le poids sec du sol est déterminé selon la norme NF ISO 11465 (AFNOR 1994a). Une coupelle en aluminium est séchée à 105°C pendant au moins 45 min et placée ensuite dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement puis pesée (**m1**). Une prise d'essai de 10 à 15 g de sol humide est placée dans la coupelle et pesée (**m2**). Après séchage à 105°C pendant au moins 24 h, la coupelle est déposée dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement puis est à nouveau pesée (**m3**). Le pourcentage d'humidité résiduelle (%HR) est déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ HR} = \frac{[(m3 - m1) - (m2 - m1)]}{(m3 - m1)} \times 100 \quad (m1, m2, m3 : \text{en g})$$

### 1.2.4. Détermination de la capacité au champ

Le protocole est réalisé à partir de celui établi par la SADEF (Société Alsacienne pour le Développement et l'Etude des Fertilisants, 68, France – méthode interne : MA7-38T) sur un sol séché et tamisé à 2 mm. Le fond d'un pot en nalgène de 125 mL est percé d'un trou de 0,5 cm de

diamètre et est ensuite recouvert d'un disque épais en aluminium. L'ensemble est pesé (**M1**), puis le pot est ensuite rempli de terre tamisée à 2 mm, qui aura au préalable été séchée 48h à température ambiante. L'ensemble qui doit avoisiner les 80 g est légèrement tassé et pesé (**M2**). Le tout est placé dans un récipient contenant de l'eau distillée dans lequel se trouve un système de mise à niveau. L'eau est ajustée à une hauteur telle que le fond du pot soit recouvert de 0,5 cm d'eau. Le récipient est alimenté en eau par un vase de compensation. Au bout de 24h, le pot est sorti du récipient, couvert et pesé (**M3**) après une période de repos de 15 min. Le calcul de la capacité de rétention (CR) est le suivant :

$$CR = \frac{(M3 - M2) + [(M2 - M1) * HR/100] * 100}{(M3 - M1) * (100 - HR)/100}$$

(M1, M2 et M3 : en g) ; HR en %.

### 1.2.5. Teneur totale en métaux du sol

Après prétraitement selon la norme NF ISO 11464 (AFNOR 2006), 0,5 g d'échantillon de sol est introduit dans un récipient en téflon. La minéralisation acide du sol est obtenue en ajoutant 3 mL d'HCl 37 % (v/v) (Roth) et 9 mL d'HNO<sub>3</sub> 65% (v/v) (Roth) ; selon le protocole N°3051A de l'EPA (Link *et al.*, 1998). Le programme utilisé avec un micro-onde Milestone ETHOS est résumé ci-dessous.

N° phase	Température	Temps de minéralisation	Puissance maximale utilisée
1	0°C -90°C	3 min	1000 W
2	90°C -130°C	5 min	1000 W
3	130°C -190°C	4 min	1000 W
4	190°C	10 min	1000 W
5	Ventilation	20 min	1000 W

Le minéralisât est repris dans de l'eau ultra pure (EUP, obtenue par l'appareil Elgastat UHQ-PS), puis le volume est ajusté à 10 ml et l'échantillon est filtré sur un filtre membrane en acétate de cellulose Dustcher de 0,45µm et analysé par ICP-AES (Inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy). La rétention des métaux suite à la filtration des solutions métalliques sur les filtres membranes en acétate de cellulose (Dutscher) a été contrôlée et a été considérée comme négligeable (<2% ).



### 1.2.6. Teneurs en CrVI et CrIII du sol

Les différentes formes du chrome sont dosées par la méthode MA 200-CrHex 1.0 du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (2004), applicable aux échantillons solides et aqueux. Le CrVI réagit avec le diphényl-carbazide pour former en milieu acide un complexe rose à violet dont l'absorbance à 540 nm est proportionnelle à la concentration en chrome hexavalent.

Une prise d'essai d'1 g d'échantillon humide de sol est introduite dans un erlen de 100 mL en présence de 40 mL de solution extractive préparée avec 20g/L de NaOH (Roth) et 30 g/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Roth). Le mélange est chauffé à ébullition sur une plaque chauffante tout en agitant avec un barreau aimanté et en évitant l'évaporation totale. Une fois refroidie, la solution est filtrée sur papier Whatman dans un nouvel erlen. Le premier erlen et le filtre sont rincés trois fois avec de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 7-8 avec HNO<sub>3</sub> 6M. Le mélange est transféré dans une fiole de 100 mL et le volume est ajusté avec de l'eau distillée. La solution est filtrée sur membrane de 0,45 µm en acétate de cellulose (Dutscher) ou centrifugée si nécessaire. Dans un tube en verre sont introduits : 5 mL d'échantillon filtrés, 4 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (Riedel de Haën), 0,2 mL d'une solution de diphényl carbazide (Fisher scientific) à 5 g/L dans de l'acétone et 0,8 mL d'eau distillée. Les tubes sont bouchés, mélangés par retournement et la densité optique est mesurée à 540 nm contre un témoin après 15 min de réaction. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Fluka) à 10 mg/L pour des concentrations finales de 0,1 à 2 mg/L.

### 1.2.7. Extraction séquentielle du chrome et du plomb

L'extraction séquentielle des métaux du sol est réalisée selon la méthode de Tessier *et al.* (1979). La verrerie est lavée au préalable avec HNO<sub>3</sub> 14% (v/v) et rincée à l'EUP. Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique et les solutions sont préparées dans de l'EUP. Cette méthode permet d'évaluer la distribution des métaux dans le sol selon 5 fractions décrites dans le **tableau II.2** obtenues par extraction séquentielle. La prise d'essai initiale est de 1 g de sol sec, introduit dans un tube en PP. Après extraction, les tubes sont centrifugés 10 min à 9400 g avec une centrifugeuse Beckman-Coulter Allegra 64R. Le surnageant de chaque fraction est récupéré, filtré sur membrane de 0,45 µm en acétate de cellulose (Dustcher) et analysé par ICP-AES pour quantifier le Cr et le Pb. Entre chaque extraction, le culot est rincé avec 8 mL d'EUP.

**Tableau II.2:** Protocole d'extraction séquentielle selon la méthode de Tessier *et al.* (1979)

Fraction métallique	Extractant	Durée, température et vitesse d'agitation
F1 (échangeable)	8 mL MgCl <sub>2</sub> 1M, pH 7,0 (Fluka)	1 h à 25°C à 200 tpm
F2 (liée aux carbonates)	8 mL de NaOAc 1 M, pH 5,0 (Fluka)	6 h à 25°C à 200 tpm
F3 (liée aux oxydes de manganèse et de fer)	20 mL NH <sub>2</sub> OH 0,04M (Fluka) dans HCl 25 % (v/v)	6 h à 96°C avec agitation occasionnelle
	3 mL de HNO <sub>3</sub> 0,02 M + 5 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (v/v) pH 2,0	2 h à 85°C avec agitation occasionnelle
F4 (liée à la matière organique)	3 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (v/v) pH 2,0	3 h à 85°C avec agitation occasionnelle
	5 mL de Na <sub>4</sub> OAc 3,2M dans 20% (v/v) HNO <sub>3</sub>	30 min à 25°C à 200 tpm
F5 (liée à la fraction résiduelle)	10 mL d'HF + 2 mL d'HClO <sub>4</sub> (Fluka)	Minéralisation à 160°C et reprise du culot dans HCl 12M

### 1.2.8. Extraction séquentielle du mercure

L'extraction séquentielle du mercure est réalisée selon la méthode de Giulio et Ryan (1987). La verrerie utilisée est lavée avec HNO<sub>3</sub> 14% (v/v) et rincée à l'EUP. Les fractions analysées ainsi que les extractants utilisés sont décrits dans le **tableau II.3**. La prise d'essai initiale est de 5 g de sol humide et les extraits obtenus sont centrifugés à 1000 g, filtrés sur membrane de 0,45 µm en acétate de cellulose (Dustcher) et analysés par ICP-AES.

### 1.2.9. Extraction simple des fractions bioaccessibles des métaux

Différentes méthodes d'extraction des fractions dites bioaccessibles des métaux dans le sol ont été testées. La masse des prises d'essai, les différents extractants et les temps d'agitation sont résumés dans le **tableau II.4**. Après extraction et centrifugation, les échantillons sont filtrés sur membrane de 0,45µm en acétate de cellulose et les concentrations en Cr, Hg et Pb sont analysées par ICP-AES.

**Tableau II.3** : Protocole d'extraction séquentielle selon la méthode de Giulio et Ryan (1987).

Fraction métallique	Extractant	Durée, température et vitesse d'agitation
<b>F1</b> (soluble à l'eau)	25 mL d'eau distillée	1 h à 25°C à 200 tpm
<b>F2</b> (échangeable)	25 mL de NH <sub>4</sub> OAc 1M (Roth)	1 h à 25°C à 200 tpm
<b>F3 FF</b> (liée aux acides fulviques)	25 mL NH <sub>4</sub> OH 1M (Roth), puis acidification du surnageant à pH 1,0 avec HCl	1 h à 25°C à 200 tpm
<b>F3 FH</b> (liée aux acides humiques)	25 mL HCl (37%) (v/v) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) (v/v)	2 h à 85°C
<b>F4</b> (liée à la matière organique et aux sulfures)	6 mL HNO <sub>3</sub> 0,02M 5 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) (v/v) NH <sub>4</sub> OAc 1M dans HNO <sub>3</sub> 6% (v/v)	2 h à 85°C 3h à 85 °C 1 h à 25°C à 200 tpm
<b>F5</b> (liée à la fraction résiduelle)	Rinçage du culot 2 fois avec 30 mL d'eau distillée H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (97%):HNO <sub>3</sub> (65%) 2:1 (v/v)	1 h à 85°C

**Tableau II.4** : Protocoles pour l'extraction des fractions dites « bioaccessibles » en métaux du sol.

Méthodes	Prise d'essai (en g de sol sec)	Extractant	Durée d'agitation	Vitesse et durée de centrifugation	Référence
<b>Eau</b>	2	10 mL EUP pH 7,0	16 h	3000 g, 10 min	Van Ranst <i>et al.</i> , 1999
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1	8 mL MgCl <sub>2</sub> 1M pH 7,0 (Fluka)	1 h	9500 g, 10 min	(Tessier <i>et al.</i> 1979)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	2	20 mL CaCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O 0,01M (Fluka) pH 7,0	2 h	2500 g, 15min	(Chen et Cutright 2001)
<b>DTPA</b>	10	20 mL de DTPA (Fluka) 0,005 M+0,01M TEA (Sigma)+0.1M CaCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O pH 7,3	2 h	3000 g, 10 min	NF ISO 14870, (AFNOR 2002)
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	4	10 mL de NaNO <sub>3</sub> 0,1M (Roth)	2 h	3000 g, 10 min	(Gupta et Aten 1993)
<b>Rhizo</b>	2	20 mL d'acide acétique, lactique et citrique, malique et formique à 0,01M (Roth) 4:2:1:1:1 (c/c)	16 h	3000 g, 10 min	(Feng <i>et al.</i> 2005)

### 1.2.10. Dosage des métaux par ICP-AES

Les analyses ICP-AES sont réalisées avec un appareil Ultima (Jobin Yvon, Horiba). Les gammes étalon sont préparées dans la même matrice que les échantillons à traiter. Les éléments analysés pour cette étude et leurs longueurs d'onde sont les suivants : **Al** (308,215 nm), **As** (193,695 nm), **Cd** (228,802 nm), **Co** (228,616 nm), **Cr** (267,716 nm), **Cu** (324,754 nm), **Fe** (259,940 nm), **Hg** (194,227 nm), **K** (766,490 nm), **Mn** (257,610 nm), **Na** (589,592 nm), **Ni** (231,604 nm), **Pb** (220,353 nm), **Si** (251,611 nm), **Zn** (213,856 nm).

Les limites de détection obtenues dans les minéralisats pour l'analyse des 3 métaux principaux de cette étude sont : 0,5 µg/L (Cr) ; 10 µg/L (Hg), 1,5 µg/L (Pb).

## 2. Caractéristiques des microorganismes étudiés

### 2.1. Souches étudiées et conditions de culture

Tous les milieux utilisés dans cette étude sont stérilisés à l'autoclave (ALV 1131, Subtil crépieux) à 115°C pendant 30 min.

Les souches utilisées pour cette étude, quatre bactéries et deux champignons, sont :

- *Aspergillus niger* CBS\* 113.46;
- *Bacillus subtilis* DSM\* 3256 ;
- *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090 ;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC\* 9027 ;
- *Ralstonia metallidurans* ATCC 43123 ;
- *Penicillium simplicissimum* CBS 288.53.

Les milieux sont inoculés à partir des souches conservées à -80°C dans du glycérol 20% (v/v) (Acros). Les bactéries sont pré-cultivées dans du milieu LB (Luria Bertani) à 28°C et 200 tpm pendant 48 h et les champignons dans du milieu malt extract (ME) à 28°C à 200 tpm pendant 5 j (voir composition des milieux de culture en **annexe 2**).

La biomasse bactérienne utilisée pour chaque expérience est récoltée dans des tubes stériles en PP et centrifugée à 9400 g pendant 10 min. Le culot est lavé deux fois dans du KCl à 9 g/L et repris dans du KCl.

Pour les champignons, seules les « pellets » sont utilisées après lavage dans du KCl à 9g/L. Après avoir ajouté des billes de verre stériles de 2 mm de diamètre, la suspension est homogénéisée à l'aide d'un vortex.

---

\* Voir table des abréviations

## 2.2. Méthodes de dénombrement de la biomasse microbienne

Le poids sec est déterminé par filtration des suspensions microbiennes sur une membrane stérile de 0,45  $\mu\text{m}$  préalablement séchée à 105°C et pesée. La membrane est déposée dans une boîte de Pétri en verre et placée dans une étuve à 105°C pendant 48h, puis pesée après refroidissement dans un dessiccateur.

Pour les bactéries, la concentration cellulaire est déterminée soit par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm avec un spectrophotomètre Beckman-Coulter DU530, soit en comptant les unités formant colonies (UFC) après un dénombrement sur milieu LBA (milieu LB gélosé) par dilution et étalement de 100  $\mu\text{L}$  de chaque dilution sur boîte. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées au moins 48h à 28°C. Pour les champignons, la concentration cellulaire est déterminée par étalement/dilution sur des boîtes de MEA (milieu ME gélosé), les boîtes étant incubées 5j à 28°C.

Les coefficients de conversion entre la biomasse (g/L), l'absorbance (DO 600 nm) et la concentration cellulaire (UFC/mL), correspondants aux différentes méthodes de dénombrement des microorganismes, sont reportés dans le **tableau II.5** pour les bactéries et le **tableau II.6** pour les champignons.

**Tableau II.5 :** Coefficients de conversion entre la concentration cellulaire (UFC/mL), la biomasse (g/L) et la densité optique (600 nm) pour les bactéries.

	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>R. metallidurans</i>
Concentration cellulaire (UFC/mL)/DO (600 nm)	$2,57.10^8$	$2,25.10^9$	$1,03.10^9$	$3,41.10^9$
Biomasse (g/L)/DO (600 nm)	0,335	0,485	0,392	0,306
Biomasse (g/L)/concentration cellulaire (cellules/mL)	$1,30.10^{-9}$	$2,16.10^{-10}$	$3,81.10^{-10}$	$8,95.10^{-11}$

**Tableau II.6 :** Coefficients de conversion entre la concentration cellulaire (cellules/mL) et la biomasse (g/L) pour les champignons.

	<i>A. niger</i>	<i>P. simplicissimum</i>
Biomasse (g/L)/concentration cellulaire (cellules/mL)	$4,10.10^{-2}$	$7,95.10^{-3}$

## 2.3. Tests de résistance aux métaux

### 2.3.1. Tests semi quantitatifs

La résistance des microorganismes, soit à un mélange de Cr, Hg et Pb, soit à un mélange de Cr, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn aux concentrations notées dans le **tableau II.7** est testée. Cette méthode semi-quantitative est basée sur la diffusion des solutions métalliques dans la gélose.

Les souches à tester sont pré-cultivées pendant 48h avant le début de l'expérience et les tests sont réalisés dans des boîtes de milieu gélosé (20 g/L d'agar) avec du milieu à l'extrait de terre pH 7,0 (voir préparation ci-dessous). Une gouttière de 0,5 cm est réalisée au centre de la boîte dans laquelle sont introduits 500 µL des solutions métalliques préparées dans de l'EUP et stérilisées par filtration sur un filtre membrane de 0,45 µm (Dustcher). Trois concentrations sont utilisées correspondant aux concentrations des métaux dans le sol B (x1), et à 5 (x5) et 10 (x10) fois cette concentration. 20 µL de suspension issue des cultures sont déposées de part et d'autre de la boîte en striant la gélose depuis le bord de la gouttière et perpendiculairement à celle-ci. Les boîtes sont mises à incuber à 28°C. La lecture se fait après 3 et 7 j d'incubation en mesurant la distance sans développement microbien. Les résultats sont notés comme suit en fonction de la distance d'inhibition : +++ : < 0,5 cm d'inhibition, ++ : <1 cm d'inhibition ; + : <2 cm d'inhibition ; - : pas de croissance.

**Tableau II.7** : Concentrations en métaux testées et nature des produits chimiques utilisés.

Elément	Concentration utilisée (en mg/L) (x1)	Composé chimique utilisé
Cd	1	Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (Merck)
Cr	490	CrCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Fluka)
Cu	150	CuCl <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O (Fluka)
Hg	15	HgCl <sub>2</sub> (Aldrich)
Ni	55	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Fluka)
Pb	380	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Riedel de haën)
Zn	350	ZnNO <sub>3</sub> (Fluka)

### Préparation de l'extrait de terre

Le milieu à l'extrait de terre est obtenu à partir du sol A selon une méthode décrite par Bourrié *et al.* (1998). Deux kilos de sol et deux litres d'eau du robinet sont placés dans un ballon de 5 L et autoclavés à 130°C pendant 60 min. Le liquide obtenu est filtré à chaud sur papier filtre standard plissé Durieux et le filtrat est centrifugé à 2000 g pendant 5 min, afin d'obtenir un

milieu clarifié, exempt de particules de terre. Le milieu est ensuite stérilisé à 115 °C pendant 30 min. Les teneurs en métaux de l'extrait de terre ont été estimées négligeables par rapport aux concentrations métalliques utilisées pour le test de résistance semi quantitatif et donc n'ont pas d'impact pour le test réalisé (**tableau II.8**).

**Tableau II.8** : Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-type) en métaux dans le milieu à l'extrait de terre.

Élément métallique	Concentration (mg/L)
Cd	0,00 $\pm$ 0,01
Cr	0,17 $\pm$ 0,01
Cu	0,12 $\pm$ 0,00
Fe	14,71 $\pm$ 1,06
Hg	0,00 $\pm$ 0,00
Mn	8,93 $\pm$ 0,04
Ni	0,12 $\pm$ 0,01
Pb	0,71 $\pm$ 0,09
Zn	0,91 $\pm$ 0,23

### 2.3.2. Tests quantitatifs

La méthode utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice en métaux est celle de Teitzel et Parsek (2003), correspondant à une version modifiée du protocole de la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), visant à minimiser la précipitation des métaux. Les souches à tester sont cultivées à 28°C pendant 12h dans du milieu MSVG (**annexe 2**). Les puits de microplaques stériles sont remplis avec 300  $\mu$ L de milieu MSVG, 25  $\mu$ L de solution métallique et 25  $\mu$ L d'inoculum (DO 600 nm = 0,3). La méthode vise à tester la résistance des bactéries à CrIII, HgII et PbII, pris individuellement pour une concentration variant de 1 à 150 mg/L. La résistance à un mélange de métaux Cr, Hg et Pb dont les proportions, correspondant à celles présentes dans le sol B, sont les suivantes 5:0,2:13, est également testée pour des concentrations en Pb allant de 1,3 à 325 mg/L. Un analyseur de croissance (Bioscreen C) permet de suivre la croissance en mesurant la DO à 600 nm, toutes les 2h après agitation, pendant une durée totale de 56h.

## 2.4. Méthodes de détection des métabolites microbiens

Les métabolites recherchés sont produits dans des milieux de culture appropriés (voir **annexe 2**):

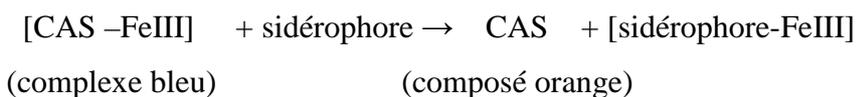
- CAA (casamino acids) pH 7,0 pour la production de sidérophores ;
- ME (malt extract) pH 6,0 pour la production de biosurfactants ;
- ST (sucrose tryptone) pH 6,0 pour la production d'acides organiques.

Chaque milieu est ensemencé avec 1% (v/v) de pré-culture bactérienne ou fongique. Au bout de 48h de culture à 28°C, 200 tpm pour les bactéries et 5j à 28°C, 200 tpm pour les champignons, la présence de métabolites est déterminée selon les méthodes décrites ci-dessous.

### Test Chrome azurol S (CAS)

La méthode universelle de Schwynn et Neilands (1987) de détection des sidérophores avec le réactif CAS (Chrome azurol S) mesure la capacité des sidérophores du surnageant du milieu de culture à dissocier le complexe [CAS-FeIII], que l'on peut considérer comme une mesure d'activité de la complexation du FeIII. Cette méthode est une méthode semi-quantitative de mesure des sidérophores car elle ne permet pas de quantifier chaque type de sidérophore présent bien que la vitesse de réaction puisse renseigner sur la nature des sidérophores majoritaires. La solution CAS-shuttle a été utilisée pour toutes les expériences de façon à accélérer la vitesse de réaction et à pouvoir lire les résultats après 2 h d'incubation quelle que soit la nature des sidérophores présents.

La détection de la disparition du complexe [CAS-FeIII] est basée sur la réaction suivante :



La verrerie doit être lavée à l'HCl 6M et soigneusement rincée à l'EUP. L'EUP est également utilisée pour la préparation des réactifs.

La solution de CAS-shuttle est préparée comme suit : 6mL de CTAB (Roth) (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) 10 mM et 10 mL d'EUP sont mélangés dans une fiole jaugée de 100 mL. Une solution de 1,5 mL de Fe (III) (1mM FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O (Roth) ; 10 mM HCl) et de 7,5 mL de la solution de CAS à 2mM (Fluka) sont ajoutés lentement au mélange précédent. Une solution tampon composée de 4,307 g de pipérazine anhydre (Fluka) dans 30 mL d'eau distillée et 6,25 mL d'HCl (37%) (v/v) est ensuite ajoutée au mélange. La solution CAS-shuttle est obtenue en rajoutant 0,1 g d'acide 5-sulfosalicylique (Sigma) puis en ajustant le volume final à 100 ml avec de l'EUP.



La présence de sidérophores est révélée en ajoutant le surnageant de l'échantillon à analyser à du réactif CAS-shuttle dans une proportion 1:1 (v/v). La DO est lue après 2 h de réaction à 630 nm. La relation entre absorbance à 630 nm et l'activité des sidérophores est linéaire jusqu'à ce que la DO de l'échantillon atteigne 0,1 ; au delà l'échantillon doit être dilué avec de l'EUP.

### **Correction du test CAS**

Cette correction doit être apportée pour la détection de sidérophores dans un milieu contenant d'autres métaux que le FeIII qui peuvent interagir avec le réactif CAS. Les microorganismes producteurs de sidérophores (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) sont cultivés dans du milieu CAA pendant 48h à 28°C. Le surnageant contenant les sidérophores est récolté après centrifugation à 9400 g pendant 10 min puis est ensuite concentré 4 fois. Puis, 100µL du surnageant, dilué de 2 à 1000 fois, est ajouté à 1,9 mL de milieu minimum (MM) (**annexe 2**) à pH 7,0 contenant ou non les métaux ajoutés individuellement ou en mélange (Pb, 13 mg/L ; Cr, 5 mg/L ; Hg, 0,2 mg/L ; Fe, 4 mg/L). Après 2 h au repos, 1 mL du mélange est prélevé et ajouté à 1 mL de réactif CAS-shuttle. La lecture de la DO à 630 nm est faite après au minimum 2h de réaction. La correction de la mesure à 630 nm est établie en mettant en relation la DO 630 nm obtenue dans le milieu minimum avec métaux et la DO 630 nm obtenue dans le milieu minimum sans métaux

### **Test « drop-collapse »**

C'est un test qualitatif qui permet de détecter la présence de biosurfactants dans le milieu par la méthode de Bodour et Miller (1998). Chaque puits d'un couvercle de microplaque est rempli avec 2 µL d'huile minérale (Aldrich). Après 1 h au repos pour équilibrer le dépôt, 5 µL de suspension bactérienne sont ajoutés au centre de la goutte d'huile. La goutte de suspension s'étale en présence de biosurfactants. Des témoins positifs sont réalisés avec du bromure d'hexadécyltriméthylammonium (Roth), qui symbolise l'action de surfactants cationiques, et avec du sodium dodécyl sulfate (Roth), qui représente les surfactants anioniques. Des témoins négatifs sont réalisés avec de l'eau distillée et le milieu ME.

### **Test alizarin red S**

Cette méthode est basée sur la détection colorimétrique des acides organiques par un indicateur de pH, l'alizarin Red S dont la zone de virage se situe entre 3,7 et 5,2 (Cunningham et Kuiack, 1992). Une solution d'alizarin red S (Riedel de Haën), à 0,1% (v/v), est ajoutée au surnageant de l'échantillon à tester dans une proportion 1:1 (v/v). Au bout de 15 min, les essais virant du rouge au jaune sont considérés comme positifs.

### 3. Caractéristiques des plantes étudiées et analyses

#### 3.1. Plante modèle des études en laboratoire : le maïs

La plante modèle utilisée pour cette étude est *Zea mays* L., variété Benicia. Pour chaque expérience, les graines sont stérilisées à température ambiante, selon le protocole de Benizri *et al.* (1995). Les graines sont placées dans un bécher en verre et recouvertes d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95% (v/v) pendant 30 sec et rincées abondamment à l'eau du robinet. Les graines sont ensuite réparties dans des tubes en PP stériles de 50 mL, dans lesquels sont ajoutés 25 mL d'éthanol 95% (v/v). Les tubes sont ensuite agités 5 min à 200 tpm. L'éthanol est éliminé, les graines sont rincées à l'eau distillée stérile, puis 30 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% (v/v) (Fluka) sont ajoutés et les tubes sont agités 30 min à 200 tpm. Les graines sont transférées dans un nouveau tube stérile, après avoir éliminé l'eau oxygénée par 5 rinçages successifs à l'eau distillée stérile, par agitation pendant 10 min à 200 tpm. Les graines sont ensuite mises à germer en conditions stériles dans une boîte de Pétri en verre, contenant du papier filtre imbibé d'eau distillée, à l'obscurité à 28°C pendant 3j.

#### 3.2. Analyse des teneurs en métaux dans les végétaux

Les feuilles et les racines sont lavées respectivement à l'eau distillée et à l'EDTA (Fluka) 20mM puis rincées à l'eau distillée. Les échantillons sont séchés à 25°C pendant 1 semaine. Lorsque le poids de l'échantillon est supérieur à 1g, le tissu végétal est broyé dans un broyeur RETSCH ZM200 de façon à avoir un échantillon homogène. Une prise d'essai de 0,25 g est introduite dans un réacteur en téflon dans lequel sont ajoutés 8 mL d'HNO<sub>3</sub> 65% (v/v) et 2 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v), selon le protocole préconisé par le fournisseur du micro-onde. L'ajout d'eau oxygénée a pour but de diminuer la formation des vapeurs nitriques et éviter ainsi la volatilisation du mercure pendant le processus de minéralisation. Les échantillons sont minéralisés dans le four à micro-onde ETHOS (Milestone) selon le programme suivant :

N° phase	Température	Temps de minéralisation	Puissance maximale utilisée
1	0°C -180°C	10 min	1000 W
2	180°C	10 min	1000 W
3	Ventilation	20 min	1000 W

Le minéralisât est repris dans de l'EUP et ajusté à 10 ml dans une fiole jaugée. Après filtration sur membrane de 0,45 µm en acétate de cellulose (Dutscher), la concentration en Cr, Hg et Pb des minéralisâts est déterminée par ICP-AES.

## 4. Présentation et description des plans d'expérience

### 4.1. Etude de la spéciation du Cr et du Pb dans des microcosmes de sol bioaugmentés

Les échantillons de sols utilisés (A et B), sont séchés à température ambiante pendant 1 semaine puis amenés à 20% d'humidité avec de l'eau distillée et laissés au repos 24 h. La terre est ensuite répartie de façon non stérile en lots de 200 g dans des pots de verre.

0,02 g de cellules libres de chaque microorganisme suivant, est inoculé par kg de sol : *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *R. metallidurans*, *A. niger* ou *P. simplicissimum*, après préculture et récolte comme indiqué au paragraphe 2.1. La terre ainsi inoculée est homogénéisée à l'aide d'une spatule stérile. Les pots sont ensuite mis à incuber à l'obscurité à 20°C dans une chambre climatisée. L'humidité des pots est régulièrement contrôlée par pesée et ajustée avec de l'eau distillée stérile. Un témoin non bioaugmenté est réalisé pour chaque sol.

Des prélèvements de 4 g de sol humide par pots sont effectués au début de l'expérience (T0) et toutes les semaines pendant 3 semaines (T1, T2, T3). Ces prélèvements sont utilisés pour dénombrer les microorganismes totaux et ceux potentiellement producteurs de métabolites (acides organiques, biosurfactants et sidérophores) ainsi que pour l'analyse de spéciation des métaux selon le protocole de Tessier (1979). Le pH et Eh sont mesurés en début et en fin d'expérience ainsi que la teneur en métaux totaux.

#### **Extraction des microorganismes du sol**

Les microorganismes sont extraits en agitant 2 g de sol humide avec 20 mL de KCl à 9g/L dans des tubes en PP de 50 mL stériles, 1 h à 200 tpm et à température ambiante.

On procède au dénombrement des microorganismes sur microplaques stériles de 96 puits en PP. Des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  sont réalisées pour les témoins et de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$  pour les essais inoculés. Chaque microplaque contient 180  $\mu$ L de milieu approprié et estensemencée avec 20  $\mu$ L de chaque dilution :  $10^{-2}$  à  $10^{-6}$  pour les témoins,  $10^{-3}$  à  $10^{-7}$  pour le dénombrement des microorganismes produisant des métabolites,  $10^{-4}$  à  $10^{-8}$  pour le dénombrement des microorganismes hétérotrophes totaux. Les microplaques sont incubées 5 j à 28°C et 200 tpm. La révélation des plaques se fait en comptant le nombre de puits positifs par colonne et en reportant ces résultats dans une feuille Excel permettant de déterminer les concentrations microbiennes selon la méthode du nombre le plus probable (Briones et Reichardt, 1999).

### **Dénombrement des microorganismes hétérotrophes totaux.**

Pour le dénombrement des microorganismes totaux, le milieu utilisé est du TSB (tryptic soy broth) dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  ajusté à pH 7,0 (**annexe 2**). Après incubation à 28°C pendant 5j, les puits positifs sont ceux où un trouble apparaît.

### **Dénombrement des microorganismes potentiellement producteurs de métabolites**

Les milieux de culture utilisés pour dénombrer les microorganismes producteurs d'acides organiques, de biosurfactants et de sidérophores sont respectivement les milieux ST, ME et CAA.

Pour la détection des microorganismes producteurs d'acides organiques, les puits virant du rouge au jaune après incubation et après ajout de 100  $\mu\text{L}$  d'alizarin red S à 0,1% sont considérés comme positifs. La détection des puits positifs pour les microorganismes producteurs de biosurfactants se fait comme décrit au paragraphe 2.3.2. La révélation des puits positifs dans les microplaques servant au dénombrement des microorganismes producteurs de sidérophores se fait en ajoutant 100 $\mu\text{L}$  de la solution CAS-shuttle concentrée deux fois. La lecture est faite visuellement 2 h après l'ajout du réactif ; les puits positifs sont ceux ayant viré du bleu-violet à l'orange. La lecture des résultats dans les microplaques par un spectrophotomètre à 630 nm ne peut être envisagée du fait du dépôt bactérien au fond de chaque puits.

## 4.2. Optimisation de l'activité des sidérophores

### 4.2.1. Influence de la source carbonée sur l'activité des sidérophores

Les souches testées (*P. aeruginosa* et *P. fluorescens*) sont précultivées comme décrit au paragraphe 2.1. Les tests sont réalisés dans des erlenmeyers de 100 mL, bouchés par du coton cardé, contenant 75 mL de milieu minimum pH 7,0 sans Fe (**annexe 2**).

Le test est réalisé avec des cultures de cellules libres ( $6,7 \cdot 10^7$  cellules/mL) inoculées dans chaque erlen. Différents substrats carbonés : amidon (Fisher), fructose (Roth), glucose (Roth), glycérol (Roth), mannitol (Roth), lactose (Roth), lait écrémé (Beckton Dickson) et sucrose (Roth) ont été testés à deux concentrations (0,67 g/L et 6,7 g/L). Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans ajout de substrat.

Les erlens sont incubés à 28°C, 200 tpm, et des prélèvements de 1 mL de milieu sont effectués quotidiennement pendant 8 j ; sur lesquels la croissance et l'activité des sidérophores sont analysées. La croissance des cellules est mesurée à 600 nm et l'activité des sidérophores est mesurée avec le test CAS à 630 nm.

La production spécifique des sidérophores est calculée comme suit :

Production spécifique =  $[(\text{DO surnageant à } 630 \text{ nm}) \times 1.10^{10}]/[\text{concentration cellulaire en cellules/mL}]$

#### 4.2.2. Influence des substrats et des métaux sur l'activité des sidérophores

Les tests sont réalisés avec *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* dans 75 mL de milieu minimum à pH 7,0. Des inoculas de concentrations différentes sont testés : une taille d'inoculum dite faible (TIF) correspondant à  $6,7.10^4$  cellules/mL, et une taille d'inoculum dite élevée (TIE) correspondant à  $6,7.10^7$  cellules/mL.

Les quatre substrats testés : fructose, glycérol, mannitol et lait écrémé, sont ajoutés à 6,7 g/L dans chaque erlen. Un témoin est réalisé sans substrat carboné.

Pour chaque microorganisme et chaque substrat, ainsi que pour le témoin, quatre modalités sont testées :

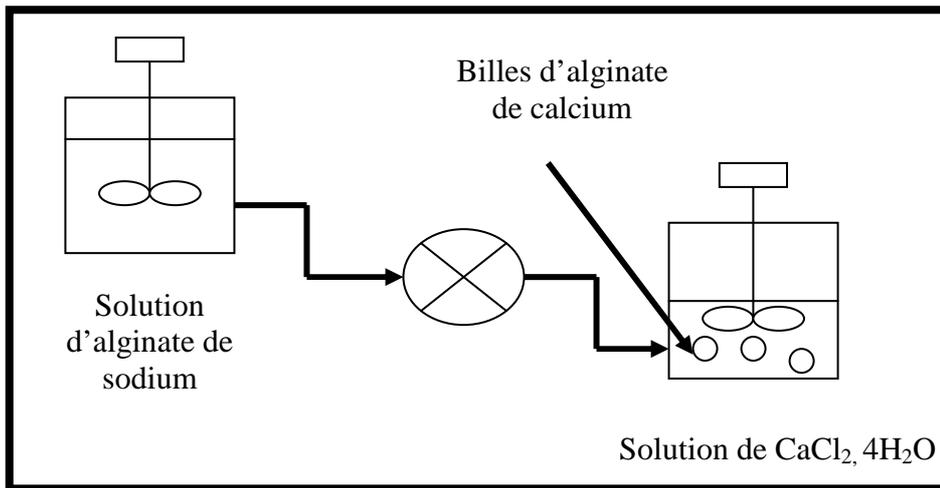
- Milieu MM seul ;
- Milieu MM avec Cr (5mg/L), Hg (0,2mg/L) et Pb (13mg/L) ;
- Milieu MM avec Fe (4 mg/L) ;
- Milieu MM avec Cr (5mg/L), Hg (0,2mg/L), Pb (13mg/L) et Fe (4mg/L).

Les erlens sont incubés à 28°C, 200 tpm, et des prélèvements de 1 mL de milieu sont effectués quotidiennement pendant 8 j ; la croissance et l'activité des sidérophores sont analysées comme décrit au paragraphe 4.2.1.

#### 4.2.3. Influence de la co-immobilisation de cellules bactériennes et de substrats sur l'activité des sidérophores.

##### 4.2.3.1. Préparation des inocula immobilisés dans des billes de Ca-alginate

Un inoculum calibré issu d'une pré-culture de 24h (paragraphe 2.1), est ajouté à 150 mL d'une solution stérile d'alginate de sodium à 30 g/L, dans un erlen de 500 mL. La solution est homogénéisée pendant au moins 30 min. La solution d'alginate est ensuite introduite stérilement goutte à goutte grâce à une pompe péristaltique, dans un erlenmeyer contenant 700 mL de  $\text{CaCl}_2$  stérile, à 30g/L, sous agitation permanente comme indiqué sur la **figure 2.1**. Les billes une fois formées restent dans la solution de  $\text{CaCl}_2$  environ 90 min à 200 tpm pour assurer une bonne réticulation. Le  $\text{CaCl}_2$  est ensuite éliminé et les billes sont lavées à l'eau distillée stérile pendant 2h à 200 tpm. Les billes sont utilisées directement ou conservées à 4°C au maximum 1 semaine.



**Figure 2.1** : Schéma de fabrication des billes d'alginate de calcium (Jézéquel 2003).

La croissance dans les billes a été déterminée par mesure de la densité optique à 600 nm après dissolution de 10 billes dans 5 mL de tri-sodium citrate à 50 mM (Prolabo) et par étalement/dilution sur des boîtes de LBA après avoir dissout les billes. Les coefficients de conversion de la densité optique à 600 nm en concentration cellulaire (UFC/mL) sont reportés dans le **tableau II.9**.

**Tableau II.9** : Coefficients de conversion entre la concentration cellulaire (UFC/mL d'alginate) et la densité optique à 600 nm pour les microorganismes immobilisés dans des billes de Ca-alginate.

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>
Concentration cellulaire (cellules/mL d'alginate)/ DO(600 nm)	$1,70 \cdot 10^9$	$7,09 \cdot 10^8$

#### 4.2.3.2. Etude de l'immobilisation du glucose

L'immobilisation d'un sucre simple dans des billes d'alginate de calcium est testée. Une solution de glucose à 200 g/L est ajoutée stérilement à une solution d'alginate de sodium à 60 g/L dans une proportion 1:1, de façon à avoir des billes de Ca-alginate à 30 g/L avec 100 g/L de glucose.

Des prélèvements de 1 mL sont effectués dans la solution de  $\text{CaCl}_2$  à 30 g/L au moment de la formation des billes, en début et en fin de polymérisation, c'est à dire au bout de 90 min. De la même façon des prélèvements ont été effectués dans l'eau de rinçage de billes en début de lavage et au bout de 2 h, en fin de lavage. La concentration en glucose des différents échantillons

prélevés est analysée à l'aide d'un kit D-glucose (Boehringer Mannheim) pour évaluer un éventuel relargage du glucose des billes.

#### 4.2.3.3. Cinétique d'adsorption de métaux sur les billes de Ca-alginate.

Des billes d'alginate de calcium sont préparées comme décrit au paragraphe 4.2.3.1 sans inoculum (billes seules, BS), avec un inoculum de *P. fluorescens* de  $1,0 \cdot 10^6$  cellules/mL d'alginate (cellules immobilisées et faible taille d'inoculum, CI TF) et avec un inoculum de  $1,0 \cdot 10^9$  cellules/mL d'alginate (cellules immobilisées et taille élevée d'inoculum, CI TE). Des cellules libres (CL) de *P. fluorescens* ont également été testées pour leur capacité d'adsorption à une concentration de  $6,7 \cdot 10^7$  cellules/mL de milieu.

Les cellules libres et les billes d'alginate (30g) sont introduites dans des erlens contenant 400 mL d'EUP, dans lesquels les solutions métalliques sont ajoutées aux concentrations suivantes : Cr : 5 mg/L ; Fe : 4 mg/L ; Hg : 0,2 mg/L et Pb : 13 mg/L. L'adsorption d'un mélange de Cr, Hg et Pb est testée avec et sans Fe, ainsi que l'adsorption du Fe seul.

Les erlens sont incubés à 28°C à 200 tpm et des prélèvements de 4 mL sont effectués aux temps suivants : 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 et 500 minutes.

Les échantillons sont filtrés sur une membrane de 0,45 µm puis dosés par ICP-AES. Le temps d'équilibre est déterminé ainsi que le pourcentage maximal d'adsorption de métal à l'équilibre (quantité de métal adsorbé/ quantité de métal initiale dans le milieu). La capacité de fixation spécifique ( $q_e$ ) est calculée selon la relation de Volesky (1990) :

$$q_e = [V \cdot (C_0 - C_e)] / M$$

$q_e$  : quantité de métal fixé par gramme d'adsorbant (mg/g)

V : volume de la solution (L)

$C_0$  : concentration initiale du métal (mg/L)

$C_e$  : concentration du métal à l'équilibre (mg/L)

M : masse de l'adsorbant (g)

#### 4.2.3.4. Influence de la co-immobilisation sur l'activité des sidérophores.

Les tests sont réalisés avec *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* dans le milieu minimum à pH 7,0. Les inocula sont introduits dans des erlenmeyers contenant 75 mL de milieu minimum, soit sous forme libre (CL) soit sous forme immobilisée dans des billes d'alginate de calcium (CI). L'ajout du lait écrémé est également testé soit dans le milieu avec cellules libres à une concentration de 6,7 g/L (CL lec) soit en l'ajoutant dans les billes à une concentration de 100 g/L d'alginate (CI lec), les quantités introduites étant équivalentes au final. Deux tailles d'inoculum

sont testées : une taille d'inoculum dite faible (TIF) de  $6,7 \cdot 10^4$  cellules/mL pour CL, soit  $1,0 \cdot 10^6$  cellules/mL d'alginate pour CI, et une taille d'inoculum dite élevée (TIE) de  $6,7 \cdot 10^7$  cellules/mL pour CL, soit  $1,0 \cdot 10^9$  cellules/mL d'alginate pour CI. Sachant que 5 g de billes sont introduits par erlenmeyer, les quantités d'inoculum libre et immobilisé sont identiques.

Pour chaque microorganisme quatre modalités sont testées :

- Milieu MM seul ;
- Milieu MM avec Cr (5mg/L), Hg (0,2mg/L) et Pb (13mg/L);
- Milieu MM avec Fe (4 mg/L) ;
- Milieu MM avec Cr (5mg/L), Hg (0,2mg/L), Pb (13mg/L) et Fe(4mg/L).

Une fois inoculés, les milieux sont incubés à 28°C et 200 tpm. Des prélèvements de 1 mL de milieu sont effectués quotidiennement pendant 8 j, la croissance microbienne et l'activité des sidérophores sont analysées. La croissance dans les billes est mesurée comme décrit au paragraphe 4.2.3.1. Pour les milieux avec lait écrémé, du fait de l'opacité du milieu, la croissance bactérienne n'est pas mesurée par spectroscopie mais par étalement/dilution sur des boîtes de LBA.

### 4.3. Etude de la survie des microorganismes inoculés dans le sol

#### 4.3.1. Transformation des bactéries

Le marquage des souches *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *R. metallidurans* avec le plasmide pPROBE-GT Kan portant un gène codant pour la GFP (green fluorescent protein) et un gène de résistance à la rifampicine a été réalisé par conjugaison tri-parentale avec les souches suivantes :

- Souche donneuse : *E.coli* pPROBE-GT Kan, Gm<sup>r</sup> (25 mg/L) (Miller *et al.* 2000) ;
- Souche helper : *E. coli* K12 HB101 pRK2013, Km<sup>r</sup> (25 mg/L) (DSM 5599).

Toutes les souches sont cultivées 48h à 28°C dans du milieu LB avec 25 mg/L de rifampicine (Rif) pour la souche receveuse de façon à sélectionner des mutants résistants, 25 mg/L de kanamycine (Km) pour la souche « helper » et 25 mg/L de gentamycine (Gm) pour la souche donneuse.

Le protocole de transformation consiste à précultiver les souches dans du milieu LB sans antibiotiques, 12 h à 28°C et 200 tpm. 250µL de ces cultures sont repiqués dans du LB pour le « helper » et le donneur, et dans un milieu pauvre pour la souche receveuse (CAA ou MM). Les suspensions sont incubées environ 8h à 28°C et 200 tpm jusqu'à obtenir une DO de 0,5 à 600 nm. 2 mL de chaque suspension sont centrifugés à 9400 g pendant 10 min. Les surnageants sont éliminés et les culots sont lavés et repris avec 100 µL de KCl à 9g/L. Le témoin de l'expérience



consiste à mélanger 50  $\mu\text{L}$  de la suspension du donneur et 50  $\mu\text{L}$  de celle du receveur. Les mêmes proportions sont utilisées pour la transformation des souches en ajoutant 50  $\mu\text{L}$  de helper au mélange. Des dépôts de 25  $\mu\text{L}$  du mélange sont déposés sur une boîte de LBA mise ensuite à sécher pour assurer un bon contact entre les cellules. Les boîtes sont incubées 24h à 28°C et les dépôts sont ensuite repris dans du KCl à 9g/L. Les suspensions obtenues sont étalées sur des boîtes de LBA contenant 50 mg/L de Gm et 50 mg/L de Rif. Chaque souche utilisée est étalée individuellement sur boîte avec antibiotiques pour vérifier qu'il n'y ait pas de résistance spontanée. Les boîtes sont ensuite incubées 48h à 28°C. Les propriétés métaboliques de chaque transformant, leur fluorescence et la stabilité du plasmide sont ensuite vérifiées. Le rendement de transformation est calculé en déterminant le nombre de cellules transformées rapporté au nombre de cellules initialement présentes.

#### **Contrôle des souches transformées**

Les paramètres de croissance des souches transformées sont déterminés sur milieu LB ainsi que leur capacité à produire des acides organiques, des biosurfactants ou des sidérophores, selon la souche.

La stabilité du plasmide est vérifiée par comptage des cellules fluorescentes au microscope à épifluorescence NIKON Eclipse E600, sur cellule de Neubauer. Un inoculum (1% v/v) de chaque souche est repiqué dans un tube de milieu LB et incubé 24 h à 28°C et 200 tpm. L'opération est répétée 10 fois successivement. Le nombre de cellules fluorescentes est exprimé en pourcentage du nombre de cellules totales. Les cellules fluorescentes sont dénombrées avant chaque repiquage.

#### 4.3.2. Test de survie des microorganismes inoculés dans le sol

Les inoculas bactériens de *P. aeruginosa* (Pa), *P. fluorescens* (Pf) et *R. metallidurans* (Rm) marquées à la GFP sont préparés comme expliqué au paragraphe 2.1. Quatre formulations de l'inoculum sont utilisées (paragraphe 4.2.3.4) :

- cellules libres (CL) ;
- cellules immobilisées dans des billes d'alginate de calcium à 3% (CI) ;
- cellules libres avec du lait écrémé (CL lec) ;
- cellules immobilisées avec du lait écrémé (CI lec).

Pour les CL,  $6,7 \cdot 10^{10}$  cellules sont inoculées par kg de sol (soit environ 0,02 g cellules/kg de sol) et pour les CI, 50 g de billes à  $1,0 \cdot 10^9$  cellules/ml d'alginate (ou environ 0,4 g de cellules/kg d'alginate) sont inoculées par kg de sol. Le lait écrémé est ajouté sous forme libre avec les cellules libres à raison de 6,7 g/kg de sol ou co-immobilisé avec les cellules dans les

billes pour une concentration de 100g/l d'alginate (voir paragraphe 4.2.3.4). Le témoin correspond au sol non inoculé, mais ayant subi le même traitement que les sols inoculés (avec ou sans lait écrémé, avec ou sans billes d'alginate non inoculées).

Le sol utilisé est le sol B après ajustement à 20% d'humidité avec de l'eau distillée 24 h avant l'expérience. L'humidité des pots est contrôlée régulièrement par pesée et est ajustée avec de l'eau distillée. Les pots sont placés à l'obscurité à 20°C.

Les prélèvements ont été effectués à : 0, 3, 5, et 7 jours, puis à 2, 3, 5, et 8 semaines. A chaque prélèvement, 2 g de sol servent au dénombrement des cellules fluorescentes et de la microflore totale ; 2 g sont séchés à 25°C et servent aux analyses de spéciation des métaux. Le pH et Eh sont déterminés en début et fin d'expérience (voir paragraphe 1.2.1 et 1.2.2).

Le dénombrement des bactéries marquées à la GFP est réalisé après extraction des microorganismes dans de l'hexamétaphosphate (1,66g/L, pH 7,0) selon la méthode de Pochon et Tardieux (1957). Après agitation, les tubes sont centrifugés 5 min à 50 g et les bactéries présentes dans le surnageant sont observées sur cellules de Neubauer au microscope à épifluorescence.

Le dénombrement des microorganismes hétérotrophes totaux suit le protocole décrit au paragraphe 4.1.

## 4.4. Etude de la phytoextraction couplée à la bioaugmentation

### 4.4.1. Tests sur milieu sable/perlite stérilisé

Le test est réalisé avec des pots contenant du sable de quartz d'Alsace et de la perlite stérilisés (voir paragraphe ci-dessous), inoculés avec des cellules libres de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, ou *R. metallidurans*. L'humidité des pots est fixée à 20% avec une solution de Hoagland concentrée 5 fois (annexe 2). La moitié des pots est contaminée par des métaux de façon à obtenir une concentration finale de 13 mg de Pb/kg de support de culture, 5 mg de Cr/kg et 0,2 mg de Hg/kg et laissés au repos 24h. Les microorganismes sont cultivés et récoltés comme décrit au paragraphe 2.1 puis le culot est repris dans du milieu Hoagland. Les microorganismes sont inoculés et mélangés dans chaque pot avec une spatule stérile de façon à avoir une concentration finale de  $6,7 \cdot 10^7$  cellules/g de substrat. Un même volume de milieu Hoagland est ajouté aux pots non inoculés (témoins). Puis, 2 graines de maïs stérilisées et prégermées (voir paragraphe 3.1) sont semées par pot et les pots sont incubés 3 semaines dans une logette climatisée à 20°C avec une photopériode de 16h jour/8h nuit. La teneur en eau des pots est contrôlée et ajustée avec la solution de Hoagland concentrée 5 fois. Après 1 semaine de croissance, une des deux plantules est retirée.

Au bout de 3 semaines de culture, les végétaux sont récoltés. La biomasse foliaire et végétale est mesurée et les teneurs en métaux dans les feuilles et les racines sont analysées comme décrit au paragraphe 3.2. Le pH est contrôlé en début et fin d'expérience ;

Différents paramètres sont calculés :

- FT : facteur de translocation = [concentration en métal dans les feuilles (mg/kg MS)/ concentration en métal dans les racines (mg/kg MS)]
- FB : facteur de bioaccumulation = [concentration en métal dans les feuilles ou les racines (mg/kg MS)/ concentration en métal dans le sol (mg/kg MS)]
- V : vitesse de phytoextraction = [quantité de métal extraite par les feuilles ou les racines (µg)/ durée du traitement (j)]

#### **Préparation des pots sable/perlite**

Le prétraitement du sable est basé sur une méthode mise au point par le CRITT RITTMO (Recherche Innovation et Transfert de Technologie pour les Matières fertilisantes Organiques, Nambshheim, 68). Le sable est séché 12 h à 75 °C avant de le tamiser à 2 mm puis il est lavé dans deux bains successifs de 2,5 L d'une solution acide à 20% (v/v) d'acide chlorhydrique (35%) et de 1% (v/v) d'acide oxalique en brassant vigoureusement, pendant 20 min. Après avoir évacué la solution acide, le sable est immergé dans de l'eau distillée puis tamisé (taille de maille <50 µm), chaque poignée étant rincée avec de l'eau distillée. Au total, 8 rinçages à l'eau distillée sont nécessaires. Le pH est contrôlé et est ajusté à 6,5 par bains successifs de NaOH 10 g/L suivis de rinçages dans de l'eau distillée. Le sable est ensuite séché 5 j à 75°C et stérilisé.

La perlite est rincée trois fois à l'eau distillée pour éliminer les impuretés et séchée de la même façon que le sable. Des pots de verre sont remplis avec 600 g d'un mélange sable/perlite 2:1 (v/v) stérilisé à 120°C pendant 20 min après avoir contrôlé le pH de l'ensemble.

#### **4.4.2. Tests en pot de terre non stérile**

Une cinétique de phytoextraction sur 11 semaines a d'abord été réalisée sur des pots de terre de 1,5 kg non inoculés, humidifiés à 20% comme décrit précédemment. Deux graines de maïs stérilisée et pré-germées sont plantées dans chaque pot et une plantule est écartée au bout d'une semaine de culture. Les pots sont incubés à 20°C dans une logette climatisée avec une photopériode de 16h jour/8h nuit. A chaque temps de prélèvement (au bout de 3j puis 1, 2, 3, 5, 8 et 11 semaines de culture), les teneurs en métaux (Cr, Hg, Pb) sont analysées dans les feuilles et les racines du maïs de façon à pouvoir suivre cinétiquement l'accumulation des métaux.

Dans un deuxième temps, un test de phytoextraction couplé à la bioaugmentation a été effectué. Le protocole suit celui du paragraphe 4.3.2 à la différence que le test se fait en pots de terre de 1,5 kg ajusté à 20% d'humidité et que deux graines de maïs sont semées par pot. Les pots sont incubés à 20°C dans une logette climatisée avec une photopériode de 16h jour/8h nuit. Au bout d'une semaine, une des deux plantes est retirée. L'humidité des pots est régulièrement contrôlée et ajustée avec de l'eau distillée stérile.

Les analyses effectuées à chaque temps de prélèvement sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe 4.3.3. En fin d'expérimentation, les teneurs en métaux et la biomasse des plantes sont analysées. Le nombre de microorganismes rhizosphériques est déterminé en agitant les racines 30 min dans 25 mL de tampon phosphate PBS (**annexe 2**) et en comptant les microorganismes synthétisant la GFP par microscopie à épifluorescence. Le pH et Eh du substrat sont contrôlés au début et à la fin de l'expérience de même que la teneur en métaux totaux du sol.

#### 4.5. Analyses statistiques des résultats

La totalité des tests et des analyses décrits dans les paragraphes ci-dessus sont réalisés en triplicats. Les données sont traitées avec le logiciel STATBOX version 5.0 (GRIMMER Logiciels, 2001). Les tests réalisés sont :

- l'analyse de variance (ANOVA) à partir d'un dispositif multifactoriel en randomisation qui permet une comparaison de moyennes selon le test de Newman-keuls au seuil de 5%. Les groupes homogènes sont représentés sur les figures par les lettres a,b,c... ;
- le coefficient de corrélation de Pearson. La distribution des nuages de points pour chaque corrélation a été vérifiée sur un graphique.

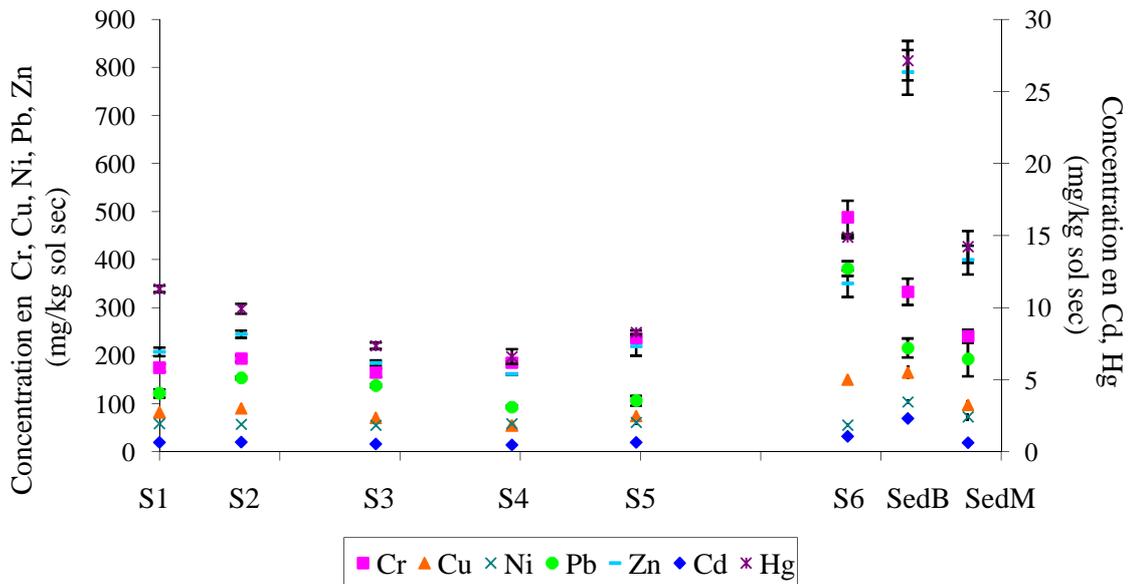


---

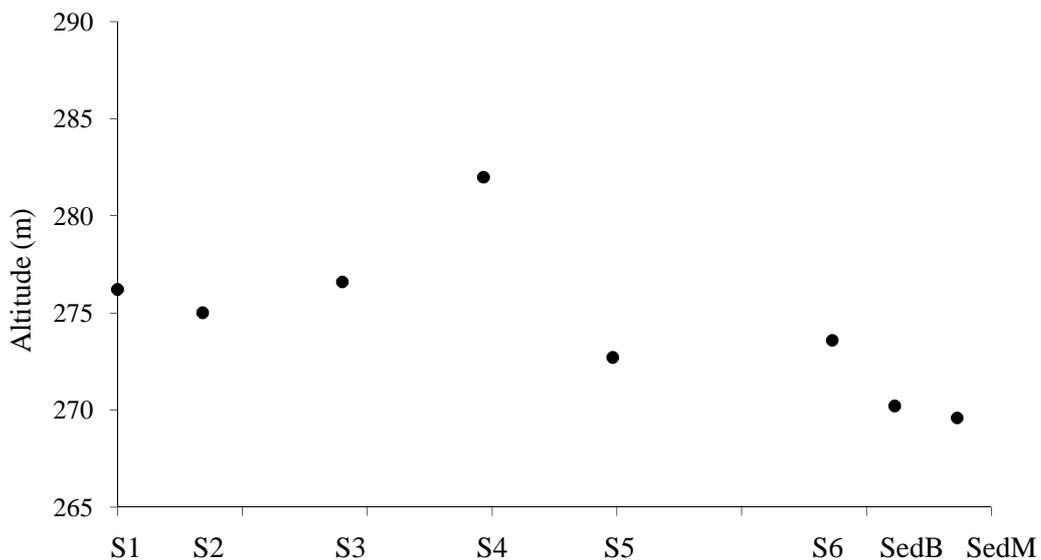
# PARTIE III : RESULTATS

## DISCUSSION

---



**Figure 3.1 :** Teneurs moyennes en métaux (mg/kg sol sec) des prélèvements de sol (S<sub>1</sub> à S<sub>6</sub>) réalisés le 09/01/2004 sur la parcelle d'étude et des sédiments au bord (Sed<sub>B</sub>) et au milieu du canal (Sed<sub>M</sub>). Les barres verticales représentent les écart-types.



**Figure 3.2 :** Altitude des points de prélèvements de sol (S<sub>1</sub> à S<sub>6</sub>) et de sédiments (Sed<sub>B</sub> et Sed<sub>M</sub>) réalisés le 09/01/2004 sur la parcelle d'étude.

# 1. Caractéristiques des sols d'étude et du matériel biologique

## 1.1. Description du site d'étude

### 1.1.1. Teneurs totales en métaux

Les teneurs en métaux des échantillons prélevés selon le transect de la parcelle agricole étudiée sont présentées sur la **figure 3.1**. En plus des échantillons de sol S<sub>1</sub> (près de la Thur) à S<sub>6</sub> (près du canal usinier), des prélèvements de sédiments ont été réalisés en bordure (Sed<sub>B</sub>) et au milieu du canal usinier (Sed<sub>M</sub>).

Les points les plus contaminés correspondent aux zones dont l'altitude est la plus basse (**figure 3.2**), c'est à dire où les eaux ont résidé le plus longtemps lors des inondations successives de la parcelle par les eaux du canal usinier la jouxtant. Ces eaux issues d'effluents industriels contenaient des éléments minéraux valorisables en agriculture, d'où l'inondation volontaire des parcelles pendant de très nombreuses années, mais également des teneurs élevées en métaux. Dans les échantillons, les teneurs les plus élevées en Cd, Cu, Hg, Ni et Zn sont celles du sédiment prélevé en bord de canal (Sed<sub>B</sub>). Le mercure, métal connu pour avoir une forte affinité pour les sédiments (Park et Curtis 1997), s'est particulièrement accumulé au point Sed<sub>B</sub>. Les teneurs en Pb et en Cr sont également maximales pour le prélèvement S<sub>6</sub> (point le plus proche du canal usinier). Ce sol correspond au sol B dans la suite de l'étude.

Le sol A choisi pour cette étude provient d'une autre parcelle de la même exploitation, et est comparable au sol B (**tableau II.1**, p87), excepté une moindre teneur en métaux (**tableau III.1**).

**Tableau III.1** : Teneurs moyennes en métaux des sols A et B ( $\pm$  écart-types). Les valeurs en gras sont celles dépassant la limite fixée par l'arrêté du 8 janvier 1998 avant épandage de boues de station d'épuration.

Elément	Teneurs en métaux dans le sol A (mg/kg sol sec)	Teneurs en métaux dans le sol B (mg/kg sol sec)	Valeurs limites, arrêté du 08/01/1998 (mg/kg sol sec)
Cd	0,60 ( $\pm$ 0,02)	1,07 ( $\pm$ 0,03)	2
Cr	<b>160,46</b> ( $\pm$ 3,01)	<b>487,88</b> ( $\pm$ 35,15)	150
Cu	51,49 ( $\pm$ 0,37)	<b>150,08</b> ( $\pm$ 6,29)	100
Fe	23192,01 ( $\pm$ 1152,41)	36390,87 ( $\pm$ 2062,98)	*
Hg	0,80 ( $\pm$ 0,11)	<b>14,89</b> ( $\pm$ 0,07)	1
Mn	983,44 ( $\pm$ 9,14)	1522,32 ( $\pm$ 84,61)	*
Ni	<b>52,36</b> ( $\pm$ 1,48)	<b>55,09</b> ( $\pm$ 3,54)	50
Pb	<b>103,64</b> ( $\pm$ 0,97)	<b>381,69</b> ( $\pm$ 15,25)	100
Zn	164,43 ( $\pm$ 3,04)	<b>350,26</b> ( $\pm$ 27,72)	300

\* : pas de valeur limite.



Les valeurs des concentrations en métaux obtenues pour le sol A sont inférieures à celles données par l'arrêté du 08/01/1998, excepté pour le Cr, le Ni et le Pb pour lesquels les concentrations excèdent légèrement celles de l'arrêté. Les teneurs en Cu, Ni et Zn du sol B sont respectivement 1,5 ; 1,1 et 1,2 fois supérieures aux valeurs de l'arrêté alors que les valeurs obtenues pour le Cr, le Hg et le Pb B sont 3, 15 et 4 fois supérieures aux valeurs de l'arrêté respectivement. Ces trois métaux sont ceux qui ont été retenus pour la suite de cette étude.

Malgré des teneurs élevées en métaux pour le sol B, l'ensilage issu de cette parcelle contient peu de métaux et les concentrations dans le lait produit sur l'exploitation sont inférieures au seuil de détection, ce qui indique qu'il n'y a pas à ce jour de transfert dans la chaîne alimentaire (**tableau III.2**). Concernant l'analyse de l'ensilage, le mélange des végétaux de plusieurs parcelles et la lixiviation des métaux accumulés dans le maïs, lors du processus de fermentation acide, peut expliquer les teneurs plus faibles que celles mesurées dans la plante entière. En effet, les concentrations en Pb obtenues pour les feuilles de maïs au stade 6-8 feuilles et au stade récolte sont respectivement 31 et 27 fois supérieures aux normes en vigueur pour les céréales.

**Tableau III.2** : Teneurs moyennes en métaux ( $\pm$  écart-types) dans le lait (mg/L), l'ensilage de l'exploitation (mg/kg MS) et le maïs récolté au stade 6-8 feuilles ou au stade récolte (mg/kg MS).

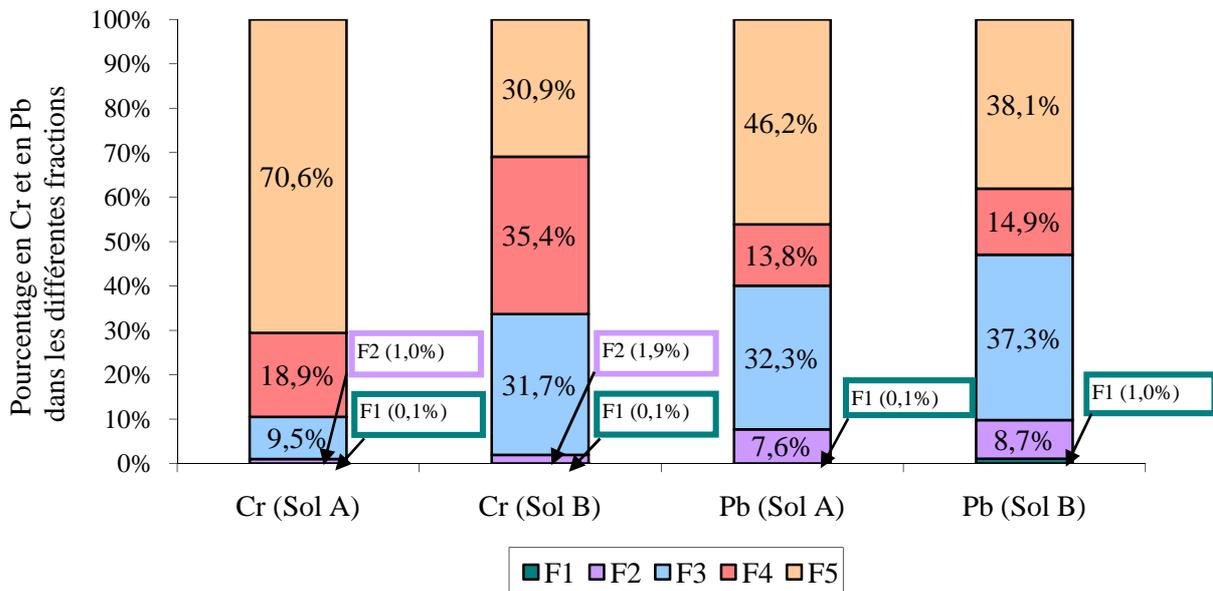
Echantillons	Métaux	Cr	Hg	Pb
Lait (mg/L)		<ld	<ld	<ld
Ensilage (mg/kg de MS)		2,42 ( $\pm$ 0,29)	0,00 ( $\pm$ 0,07)	0,19 ( $\pm$ 0,11)
Feuilles de maïs au stade 6-8 feuilles (mg/kg MS)		1,82 ( $\pm$ 0,73)	<ld	6,31 ( $\pm$ 1,51)
Racines de maïs au stade 6-8 feuilles (mg/kg MS)		45,5 ( $\pm$ 14,52)	0,74 ( $\pm$ 0,20)	28,43 ( $\pm$ 3,73)
Feuilles de maïs au stade récolte feuilles (mg/kg MS)		0,44 ( $\pm$ 0,06)	<ld	5,49 ( $\pm$ 1,25)
Racines de maïs au stade récolte (mg/kg MS)		31,62 ( $\pm$ 5,99)	0,32 ( $\pm$ 0,29)	20,00 ( $\pm$ 2,82)
Norme pour les céréales (mg/kg MS) (1)		-	0,02 ( $\pm$ 0,03)	0,20 ( $\pm$ 0,03)

<ld : inférieur à la limite de détection.

(1) Règlement (CE) N°466/2001 fixant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine.

### 1.1.2. Extraction séquentielle du chrome et du plomb

La distribution du Pb dans les sols A et B avec la méthode de Tessier (1979) donne des résultats assez similaires (**figure 3.3**) : la majeure partie du métal est soit fixée aux oxydes métalliques dans F3 (environ 35%), soit retenue dans la fraction résiduelle F5 (environ 40%). Moins de 1% du Pb est sous forme échangeable (F1) et moins de 10% sont liés aux carbonates (F2). Globalement ce schéma montre que le Pb est peu disponible dans les deux sols, la fraction disponible des métaux étant au maximum celle contenue dans les fractions F1 et F2 (Adriano 1986; Yu et Wu 1997). Lindsay reportait en 1979 que l'activité\* du Pb dans les sols agricoles était très faible :  $1.10^{-8,5}$  M soit  $0,5 \mu\text{g/kg}$  de sol.



**Figure 3.3** : Répartition (en %) des teneurs en Cr et en Pb dans les différentes fractions pour les sols A et B. (F1 : fraction échangeable ; F2 : fraction liée aux carbonates ; F3 : fraction liée aux oxydes de Fe et Mn ; F4 : fraction liée à la matière organique ; F5 : fraction résiduelle).

La distribution du Cr varie selon le type de sol. Pour le sol A, 70 % du Cr est lié à la fraction résiduelle alors que cette fraction ne représente que 31 % du Cr total pour le sol B. Dans le sol B, le Cr est principalement réparti entre la fraction résiduelle, la fraction liée à la matière organique (35%) et la fraction liée aux oxydes métalliques (32%).

Les analyses montrent que moins de 0,2% du Cr total des deux sols A et B est sous forme hexavalente (**tableau III.3**) ; la plus grande partie étant sous forme trivalente, moins mobile. Cela peut expliquer que moins de 2% du Cr total soit lié aux fractions F1 et F2 pour les deux sols qui représentent les fractions où les métaux sont potentiellement les plus mobiles.

\* Voir glossaire

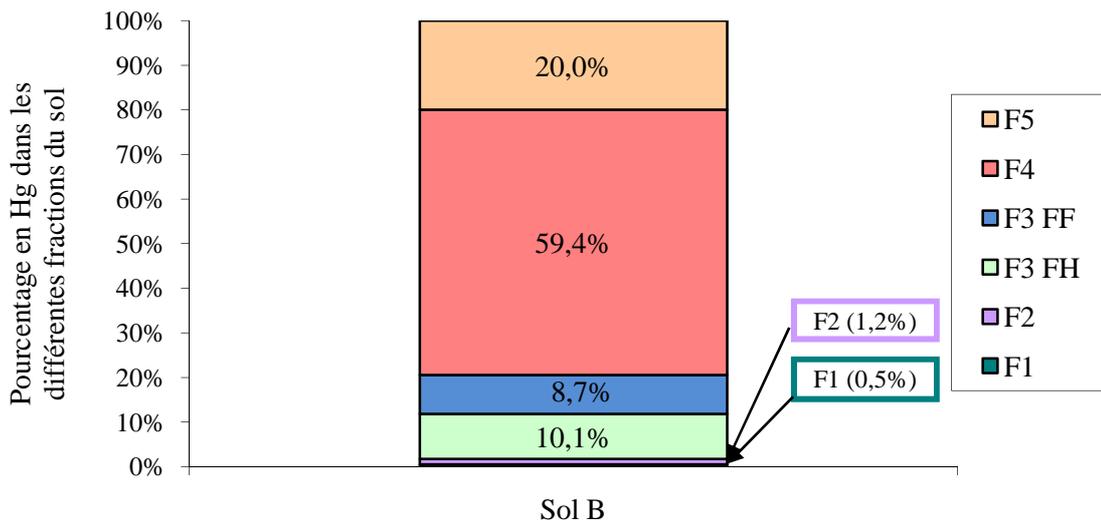
**Tableau III.3** : Teneurs moyennes en CrVI ( $\pm$  écart-types) dans les sols A et B.

Sol	Sol A	Sol B
<b>Teneurs en CrVI</b>		
Moyenne (mg/kg sol sec)	0,22 ( $\pm 0,05$ )	0,95 ( $\pm 0,10$ )
% du Cr total	<b>0,14 %</b>	<b>0,19 %</b>

La forte proportion de CrIII dans les deux sols peut s'expliquer par la nature chimique des contaminants ayant été épandus *via* les eaux du canal usinier, où peut être due aux impuretés des engrais appliqués au sol (Al-Shawi et Dahl 1999). La teneur en matière organique du sol étant relativement élevée par rapport aux valeurs de référence pour les sols agricoles (voir **annexe 1**), cela a pu contribuer à la réduction des formes de CrVI en CrIII (Banks *et al.* 2006) et peut expliquer la prédominance des formes trivalentes sur les formes hexavalentes.

### 1.1.3. Extraction séquentielle du mercure

L'étude de la distribution du Hg dans les deux sols a été réalisée par la méthode de Giulio et Ryan (1987). Les fractions métalliques du sol B sont représentées sur la **figure 3.4**. Pour le sol A, étant donné que la teneur totale en Hg – 10 fois inférieure à celle du sol B – est déjà proche de la limite de détection de 10  $\mu\text{g/L}$ , soit 0,5 mg/kg de sol sec, obtenue en ICP-AES pour le mercure (Han *et al.* 2006), la détermination des teneurs en Hg dans les fractions du sol A se révèle être peu précise et n'est donc pas présentée.



**Figure 3.4** : Répartition (en %) des teneurs en Hg dans les différentes fractions pour le sol B. (F1 : fraction soluble dans l'eau ; F2 : fraction échangeable ; F3 : liée aux acides humiques (F3 FH) ou fulviques (F3 FF); F4 : liée à la matière organique ; F5 : fraction résiduelle).

Les résultats de la figure 3.4. indiquent que le mercure est principalement lié à la fraction F4 c'est à dire à la matière organique et aux composés soufrés, ce qui est confirmé par la plupart des études sur la spéciation du mercure (Hintelmann *et al.* 1995; Wallschlager *et al.* 1998). Le pourcentage de matière organique représente en effet le facteur majeur régissant la mobilité du mercure (Yin *et al.* 1996).

Les fractions bioaccessibles sont potentiellement celles correspondant aux fractions solubles (F1) et échangeables (F2) (Wallschlager *et al.* 1998; Wang 2004). Les teneurs en mercure dans les fractions bioaccessibles F1 et F2 représentent moins de 2% du mercure total c'est à dire respectivement 0,07 et 0,17 mg/kg de sol sec. Ces teneurs étant inférieures à la limite de détection de l'appareil ICP-AES utilisé pour les analyses de cette étude, les teneurs en mercure bioaccessible du sol ne pourront pas être déterminées. Par conséquent, seules les analyses de mercure dans les végétaux seront réalisées.

#### 1.1.4. Teneurs des fractions dites bioaccessibles.

Les teneurs en métaux dans les fractions F1 et F2 déterminées par la méthode de Tessier *et al.* (1979), excepté pour le mercure, sont reportées dans le **tableau III.4**. Les valeurs obtenues pour le sol B sont généralement supérieures à celles du sol A.

**Tableau III.4** : Teneurs en métaux (mg/kg sol sec) dans les fractions F1 et F2 des sols A et B, extraites selon la méthode de Tessier *et al.* (1979), excepté pour F1 et F2 de Hg extraites selon la méthode de Giulio et Ryan (1987).

Éléments analysés	F1 Sol A (mg/kg sol sec)	F2 Sol A (mg/kg sol sec)	F1 Sol B (mg/kg sol sec)	F2 Sol B (mg/kg sol sec)	Somme F1+F2 pour sol B (mg/kg sol sec)
Al	0,16	16,62	0,00	12,96	
As	0,12	0,12	0,39	0,39	
Cd	0,16	0,80	0,39	0,85	
Co	0,12	0,48	0,00	0,31	
Cr	<b>0,08</b>	<b>0,76</b>	<b>0,47</b>	<b>4,27</b>	<b>4,74</b>
Cu	0,32	0,00	0,54	1,79	
Fe	<b>0,89</b>	<b>5,87</b>	<b>0,39</b>	<b>3,88</b>	<b>4,27</b>
Hg	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	<b>0,07</b>	<b>0,17</b>	<b>0,24</b>
K	86,86	57,61	205,46	83,05	
Mn	7,08	24,66	36,17	24,37	
Na	0,20	0,28	1,40	0,85	
Pb	<b>0,48</b>	<b>1,89</b>	<b>1,55</b>	<b>11,25</b>	<b>12,80</b>
Si	10,74	46,91	16,92	30,12	
Zn	0,16	1,89	8,15	8,07	

Dans la suite de l'étude, le choix des teneurs en métaux utilisées pour les tests de production de sidérophores en milieu liquide s'est porté sur la somme des métaux des fractions F1 et F2 du sol B, qui représentent la fraction potentiellement bioaccessible, soit : 5 mg de Cr/kg de sol sec, 0,2 mg de Hg/kg de sol sec , 13 mg de Pb/kg de sol sec et 4 mg de Fe/kg de sol sec.

### 1.1.5. Capacité au champ

La capacité moyenne calculée est de 44% pour le sol A et 42% pour le sol B. Le taux d'humidité de 20% choisi pour les deux sols, dans toutes les expérimentations, correspond à 45% environ de la capacité au champ. Le séchage du sol, le tamisage peuvent avoir modifié artificiellement cette capacité de rétention.

## 1.2. Caractéristiques des microorganismes

### 1.2.1. Croissance microbienne

Les caractéristiques de croissance des bactéries sont rassemblées dans le **tableau III.5**.

**Tableau III.5** : Biomasse maximale et taux de croissance des bactéries cultivées 48 h dans le milieu LB.

	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>R. metallidurans</i>
Biomasse maximale (cellules/mL)	1,09.10 <sup>9</sup>	6,77.10 <sup>9</sup>	3,60.10 <sup>9</sup>	1,15.10 <sup>10</sup>
Taux de croissance $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,17	0,22	0,22	0,20

Les caractéristiques de croissance des deux champignons *A. niger* et *P. simplicissimum* sont données dans le **tableau III.6**.

**Tableau III.6** : Biomasse maximale et taux de croissance des champignons cultivés 5 j dans le milieu ME.

	<i>A. niger</i>	<i>P. simplicissimum</i>
Biomasse (cellules/mL)	24,37	38,11
Taux de croissance $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,05	0,04

### 1.2.2. Production de métabolites

Les résultats de production de métabolites par les différentes souches sont donnés dans le **tableau III.7**.

**Tableau III.7** : Métabolites produits par les différents microorganismes étudiés.

	Acides organiques	Biosurfactants	Sidérophores (D0 630 nm)
<i>A. niger</i>	+	nd	nd
<i>B. subtilis</i>	nd	+	nd
<i>P. aeruginosa</i>	nd	+	0,970
<i>P. fluorescens</i>	nd	nd	0,868
<i>P. simplicissimum</i>	+	nd	nd
<i>R. metallidurans</i>	nd	nd	0,320

nd : métabolites non détectés.

Les résultats négatifs de ce tableau ne signifient pas que les microorganismes ne produisent pas les métabolites attendus (par exemple les sidérophores pour les champignons) mais que ceux-ci ne sont pas détectés par les méthodes utilisées pour cette étude.

Seuls les deux champignons produisent suffisamment d'acides organiques pour que le pH du milieu ST (sucrose tryptone), utilisé pour stimuler la production d'acides organiques (voir matériel et méthodes), diminue en deçà de la zone de virage de l'alizarine red S qui est de 5,2.

### 1.2.3. Test semi-quantitatif de résistance aux métaux

Les résultats du test de résistance semi-quantitatif sur milieu à l'extrait de terre gélosé sont présentés dans le **tableau III.8**. Les microorganismes les plus résistants aux métaux étudiés (Cr, Hg, Pb) sont la bactérie *R. metallidurans* et les deux champignons *A. niger* et *P. simplicissimum*. *R. metallidurans* possède en effet deux mégaplasmides qui lui confèrent une résistance à divers métaux tels que  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (Mergeay *et al.* 1985), et les champignons ont eux une capacité de biosorption des métaux sur leurs parois, qui les protège d'une toxicité métallique (Tobin *et al.* 1994).

Tous les microorganismes sont résistants aux concentrations en métaux totaux du sol B (notées  $\times 1$ ), ce qui est largement suffisant pour cette étude sachant que seule une faible proportion de métaux est disponible (voir paragraphe 1.1.4, p118). Les résultats montrent que le mélange de différents métaux accroît leur toxicité par comparaison aux métaux seuls (**tableaux III.8 et III.9**).

**Tableau III.8** : Test semi-quantitatif de résistance aux métaux des microorganismes cultivés sur milieu gélosé à l'extrait de terre après 7 j d'incubation à 28°C.

Mélange de métaux testés	Cr, Hg, Pb			Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn		
	×1	×5	×10	×1	×5	×10
Multiples des teneurs en métaux du sol B	×1	×5	×10	×1	×5	×10
<i>B. subtilis</i>	+++	+	-	+++	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+++	++	-	+++	+	-
<i>P. fluorescens</i>	+++	++	-	+++	+	-
<i>R. metallidurans</i>	+++	+++	++	+++	+++	++
<i>A. niger</i>	+++	+++	++	+++	++	+
<i>P. simplicissimum</i>	+++	+++	+	+++	++	+

- : pas de croissance ; +++, ++, + : résistance aux métaux.

#### 1.2.4. Test quantitatif de résistance aux métaux

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en Cr, Pb et Hg était nécessaire pour l'étude de la production des sidérophores par les *Pseudomonas* en présence de métaux. Les résultats présentés ci-dessous (**tableau III.9**) montrent que les bactéries résistent à des concentrations en métaux supérieures à celles qui ont été utilisées par la suite lors des tests en milieu liquide (Cr : 5 mg/L ; Hg : 0,2 mg/L ; Pb : 13 mg/L). Globalement *P. aeruginosa* résiste mieux aux métaux en milieu liquide que *P. fluorescens*.

**Tableau III.9** : CMI (en mg/L) pour Cr, Pb et Hg et le mélange de métaux.

	Cr (mg/L)	Hg (mg/L)	Pb (mg/L)	Mélange de métaux (mg/L)
<i>P. aeruginosa</i>	>145	15	>145	Cr : 25 ; Hg : 1,0 ; Pb : 64
<i>P. fluorescens</i>	145	5	145	Cr : 13 ; Hg : 0,5 ; Pb : 33

#### 1.2.5. Transformation des microorganismes et stabilité du plasmide

Trois microorganismes ont été transformés avec un plasmide pPROBE-GT Kan portant le gène codant pour la GFP (green fluorescent protein) (Miller *et al.* 2000). Le rendement de transformation est de  $1,3 \cdot 10^{-4}$  pour *P. aeruginosa*,  $2,4 \cdot 10^{-4}$  pour *P. fluorescens* et  $1,5 \cdot 10^{-5}$  pour *R. metallidurans*. Ces microorganismes nous permettront dans la suite de l'étude d'évaluer *in situ* la survie et la colonisation des microorganismes inoculés dans le sol.

Les résultats des tests effectués sur les souches sauvages et celles marquées à la GFP sont résumés dans le **tableau III.10**. L'analyse statistique de ces résultats (analyse de variance) montre qu'il n'existe pas de différences significatives entre le phénotype des souches sauvages et des souches marquées.

**Tableau III.10** : Valeurs moyennes des taux de croissance et de l'activité des sidérophores produits par des souches sauvages et marquées à la GFP.

	Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	Activité des sidérophores (DO 630 nm)
<i>P. aeruginosa</i>	0,198 (b)	1,023 (a')
<i>P. aeruginosa GFP</i>	0,194 (b)	0,983 (a')
<i>P. fluorescens</i>	0,180 (c)	0,890 (b')
<i>P. fluorescens GFP</i>	0,170 (c)	0,903 (b')
<i>R. metallidurans</i>	0,219 (a)	0,356 (c')
<i>R. metallidurans GFP</i>	0,221 (a)	0,387 (c')

Les tests de stabilité montrent par ailleurs qu'au bout de 10 repiquages successifs après 24 h de culture dans du milieu LB, 100% des cellules dénombrées sur cellule de Neubauer possèdent toujours le plasmide pPROBE-GT Kan. Ces résultats confirment ceux de Hallman *et al.* (2001) dont l'étude démontrait la stabilité d'une construction proche de la notre utilisée pour transformer *Rhizobium etli*, inoculé dans un milieu nutritif riche et dans la rhizosphère d'*A. thaliana*.

Le temps de génération des microorganismes étant plus élevé dans le sol (Harris et Paul 1994) que dans un milieu riche tel que le milieu LB, cela laisse supposer que ce plasmide à faible nombre de copies ne sera pas perdu durant la durée des expériences, c'est à dire au maximum 8 semaines.



## 2. Etude de la spéciation du Cr et du Pb en microcosmes de sol après bioaugmentation.

Les sols A et B ont été inoculés à chaque fois avec l'un des six microorganismes producteurs de métabolites, sélectionnés précédemment pour leur résistance aux métaux : *Aspergillus niger* et *Penicillium simplicissimum* pour la production d'acides organiques ; *Bacillus subtilis* pour la production de biosurfactants et *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Ralstonia metallidurans* pour la production de sidérophores. La souche de *P. aeruginosa* produit également des biosurfactants. L'objectif de cette étude est d'évaluer le degré d'extractabilité du Cr et du Pb du sol au cours du temps, en fonction des différents microorganismes inoculés.

### 2.1. Analyses du pH et du potentiel redox (Eh)

Les mesures effectuées au cours des trois semaines d'expérimentation montrent que le pH du sol B (6,21) est en moyenne inférieur à celui du sol A (6,94).

L'analyse de variance montre que le pH du sol A augmente significativement en fonction du temps, de T0 (début de l'expérience) à T3 (fin de l'expérience au bout de 3 semaines), quel que soit l'inoculum (**tableau III.11**). Pour le sol B aucune variation significative n'est observée entre le début et la fin de l'expérience. Cette augmentation est en moyenne de 0,3 pour le sol A entre T0 et T3. Elle pourrait s'expliquer par une adsorption de H<sup>+</sup> sur les parois microbiennes se traduisant par un appauvrissement de la solution du sol en protons et donc de l'acidité réelle.

**Tableau III.11** : Valeurs moyennes du pH<sub>eau</sub> en fonction du type de microorganisme inoculé, entre T0 (début de l'expérience) et T3 (fin de l'expérience). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Valeurs moyennes de pH	Sol A	Sol B
Témoin à T0	6,78 (d)	6,29 (a'b')
Témoin à T3	7,20 (ab)	6,48 (a')
<i>A. niger</i> à T3	7,26 (a)	6,53 (a')
<i>B. subtilis</i> à T3	6,87 (c)	6,07 (b')
<i>P. aeruginosa</i> à T3	7,14 (ab)	6,39 (a')
<i>P. fluorescens</i> à T3	7,15 (ab)	6,35 (a')
<i>P. simplicissimum</i> à T3	7,09 (bc)	6,40 (a')
<i>R. metallidurans</i> à T3	6,99 (c)	6,31 (a'b')

En fin d'expérience, pour les deux sols, le pH varie avec le facteur inoculation : le pH le plus élevé est celui du sol inoculé avec *A. niger* mais il n'est pas significativement différent du témoin (sol non inoculé). Les pH des sols inoculés avec *B. subtilis* pour les sols A et B et *R. metallidurans* pour le sol A, sont significativement plus faibles, les pH des autres sols inoculés n'étant pas significativement différents du témoin (sol non inoculé).

Les différences entre  $\text{pH}_{\text{eau}}$  et  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  étant significativement identiques quel que soit le sol et l'inoculum (données non présentées), les deux sols A et B présentent une acidité potentielle identique, malgré une CEC différente (**tableau II.1**).

Les mesures moyennes du potentiel redox sont de 344 mV pour le sol B et 279 mV pour le sol A. Ces valeurs élevées proches de 400 mV sont en général signe d'une bonne oxygénation du sol mais ne sont pas favorables à la mobilité des métaux dans le sol : en conditions oxydantes, la mobilité du Cr et du Pb est limitée par rapport à des conditions plus réductrices (Chuan *et al.* 1996).

Le pré-traitement des sols avant utilisation, tels que le tri et le tamisage, a pu contribuer à augmenter artificiellement cette valeur. De plus la méthode de mesure n'étant pas normalisée, les valeurs absolues sont à prendre avec précaution, le but initial étant surtout de pouvoir comparer ces mesures et les différences éventuelles liées à l'inoculation de microorganismes.

Le potentiel redox du sol A diminue entre T0 et T3, sauf pour les sols inoculés avec *B. subtilis*, *R. metallidurans* et *P. simplicissimum* pour lesquels le Eh augmente (**tableau III.12**).

**Tableau III.12** : Valeurs moyennes du potentiel redox (Eh) en fonction du type de microorganisme inoculé, entre T0 (début de l'expérience) et T3 (fin de l'expérience). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Valeurs moyennes Eh (mV)	Sol A	Sol B
Témoin à T0	270,00 (c)	336,00 (c'd')
Témoin à T3	242,33 (d)	340,67 (c'd')
<i>A. niger</i> à T3	260,08 (c)	293,00 (e')
<i>B. subtilis</i> à T3	320,50 (b)	360,62 (a')
<i>P. aeruginosa</i> à T3	289,33 (c)	341,00 (c'd')
<i>P. fluorescens</i> à T3	272,00 (c)	322,00 (d')
<i>P. simplicissimum</i> à T3	336,00 (a)	356,00 (b'c')
<i>R. metallidurans</i> à T3	316,67 (b)	364,33 (b')

Pour le sol B, seuls les pots inoculés avec *B. subtilis* et *R. metallidurans* voient leur Eh augmenter significativement entre T0 et T3, et l'inoculation du sol B avec *A. niger* diminue significativement le Eh. En fin d'expérience (T3), les mêmes observations sont constatées pour le sol B par rapport au sol témoin, non inoculé. En revanche, l'inoculation du sol A, quelque soit le microorganisme, augmente significativement le Eh par rapport au sol non inoculé.

## 2.2. Analyses microbiologiques

L'analyse en microplaques nous a permis de déterminer *ex situ* le nombre de microorganismes potentiellement producteurs d'acides organiques, de biosurfactants ou de sidérophores dans le sol. Cette méthode est basée sur l'extraction et la culture des microorganismes du sol dans des conditions favorisant la production et la détection de ces métabolites. En revanche elle ne renseigne pas sur la nature des métabolites ni sur la production réelle *in situ* qui nécessiterait une extraction et la détection de chaque type de métabolite dans le sol.

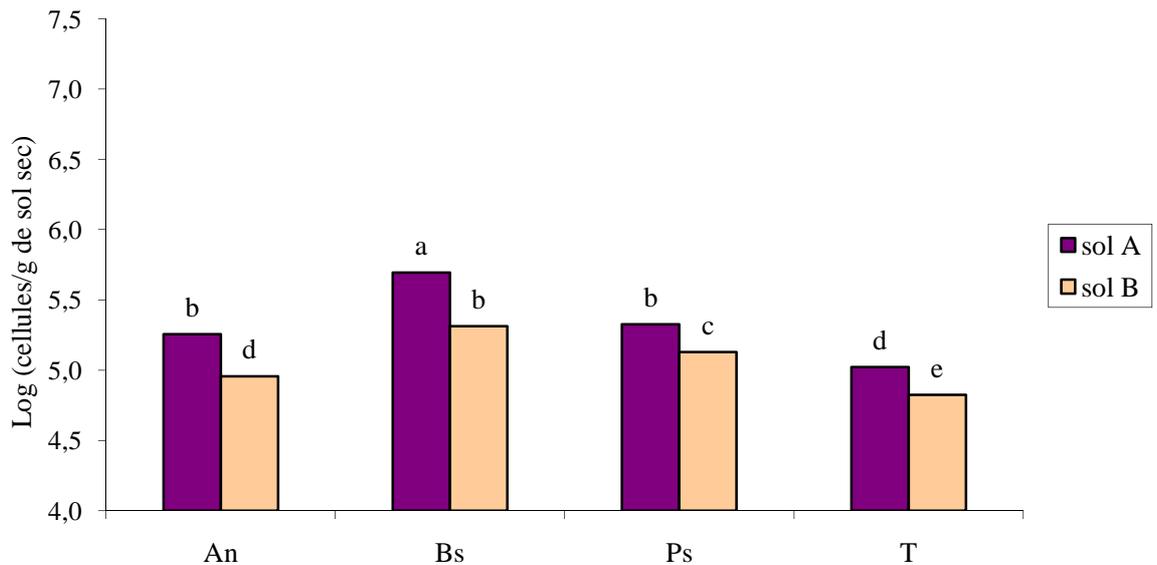
### 2.2.1. Microorganismes producteurs d'acides organiques

Le nombre de microorganismes potentiellement producteurs d'acides organiques augmente dans les sols A et B à T1 (1 semaine), que les sols soient inoculés ou non (données non présentées). Cette concentration reste stable ou diminue ensuite jusqu'à T3. Cette augmentation peut être due aux conditions contrôlées de culture (20°C, 20% d'humidité) favorisant le développement de ces microorganismes au cours du temps dans les pots témoins aussi bien que dans les pots inoculés (Andersson et Nilsson 2001).

L'absence de microorganismes potentiellement producteurs d'acides organiques dans les sols inoculés avec *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *R. metallidurans* ne signifie pas que ce nombre soit nul mais qu'il est inférieur au seuil de détection de la méthode utilisée soit 2,75 Log (cellules/mL) (**figure 3.5**). L'inoculation de ces bactéries a cependant provoqué un effet inhibiteur sur les microorganismes producteurs d'acides organiques, puisque le nombre de microorganismes est inférieur au seuil de détection mais également inférieur au témoin, non inoculé. En effet, les *Pseudomonas* fluorescents sont connus pour leur rôle d'agents de contrôle biologique en sécrétant des composés antibiotiques tels que les phloroglucinols ou les sidérophores (Bloemberg et Lugtenberg 2001; Russo *et al.* 1996).

Les sols inoculés avec *B. subtilis*, *A. niger* et *P. simplicissimum* présentent une concentration en microorganismes producteurs d'acides organiques supérieure au témoin, non inoculé. Ainsi, soit ces microorganismes sont directement impliqués dans cette croissance, soit leur inoculation a modifié la diversité microbienne du sol au profit de microorganismes

producteurs d'acides organiques. Globalement, les concentrations sont plus élevées pour le sol A que pour le sol B (0,3 Log de différence en moyenne). Ces valeurs supérieures dans le sol A sont sans doute à mettre en relation avec la moindre contamination en métaux. Les sols inoculés avec *B. subtilis* sont ceux qui contiennent le plus de microorganismes producteurs d'acides organiques suivis de ceux inoculés avec *P. simplicissimum* et *A. niger*. La diminution du pH pour les sols inoculés avec *B. subtilis* s'expliquerait par une plus forte concentration en microorganismes producteurs d'acides organiques. Cette baisse de pH est par ailleurs, indépendamment du facteur temps, plus importante pour le sol A (0,12) que pour le sol B (0,08).



**Figure 3.5 :** Concentration moyenne en microorganismes potentiellement producteurs d'acides organiques, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé : An : *A. niger*, Bs : *B. subtilis*, Ps : *P. simplicissimum*, T : témoin (sol non inoculé). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Le rôle des inocula dans la production d'acides organiques peut se vérifier en rapportant la concentration en microorganismes producteurs d'acides organiques à celle des microorganismes totaux (**tableau III.13**). Au vu des résultats, seule l'inoculation de *B. subtilis* dans le sol A semble efficace par rapport au témoin. L'augmentation du ratio est le signe que l'inoculation de *B. subtilis* a bien contribué à l'augmentation du nombre de microorganismes producteurs d'acides organiques. Ces résultats confirment également que l'inoculation avec *A. niger* ou *P. simplicissimum* a favorisé le développement de microorganismes producteurs d'acides organiques sans que ces souches soient directement impliquées.

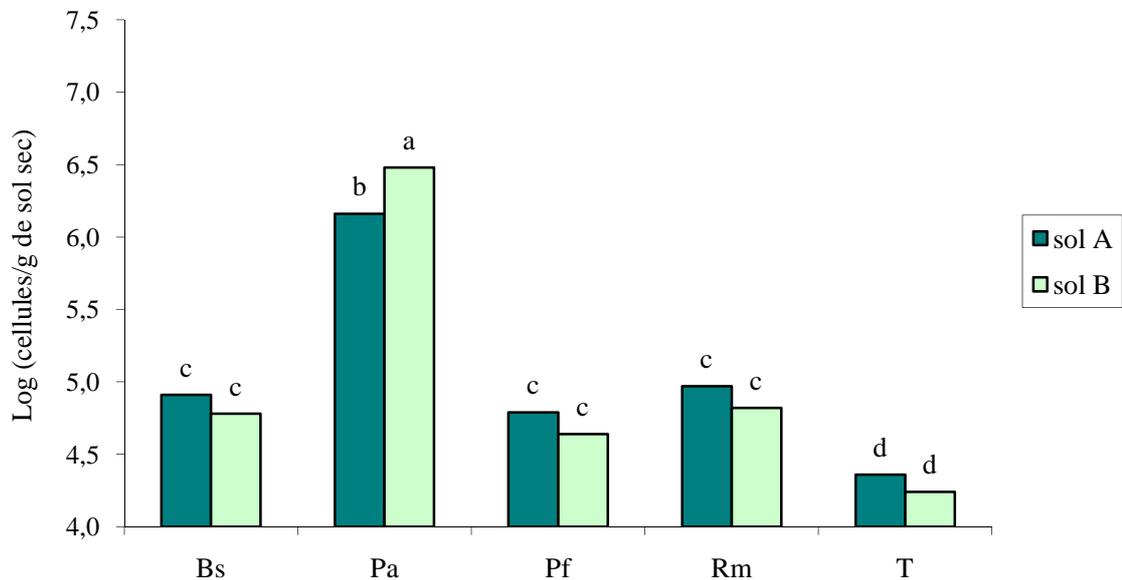
**Tableau III.13** : Ratio moyen de la concentration en microorganismes producteurs d'acides organiques (AO)/concentration en microorganismes totaux (M), indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Ratio AO/M	Sol A	Sol B
Témoin	0,023 (bc)	0,013 (c)
<i>A. niger</i>	0,033 (b)	0,005 (c)
<i>B. subtilis</i>	0,076 (a)	0,022 (bc)
<i>P. simplicissimum</i>	0,038 (b)	0,010 (c)

### 2.2.2. Microorganismes producteurs de biosurfactants

Dans les sols inoculés, le nombre de microorganismes potentiellement producteurs de biosurfactants augmente à T1, révélant la croissance des microorganismes inoculés ou celle de la microflore indigène impliquée dans la production de ce type de métabolite, puis diminue jusqu'à T3 (données non présentées). Les valeurs du témoin ne varient pas significativement au cours du temps.

La concentration la plus élevée en microorganismes producteurs de biosurfactants est obtenue en inoculant les sols A et B avec *P. aeruginosa* (figure 3.6).



**Figure 3.6** : Concentration moyenne en microorganismes potentiellement producteurs de biosurfactants, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé : Bs : *B. subtilis*, Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (sol non inoculé). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

L'inoculation du sol avec les deux champignons étudiés réduit le nombre de microorganismes producteurs de biosurfactants puisque la concentration obtenue est inférieure au seuil de détection et au témoin non inoculé. Les concentrations obtenues avec *B. subtilis*, *P. fluorescens* et *R. metallidurans* sont légèrement supérieures au témoin. Les souches de *R. metallidurans* et *P. fluorescens* utilisées pour cette étude ne produisant pas de biosurfactants, leur inoculation a sans doute stimulé la croissance d'autres microorganismes producteurs dans le sol.

Aucune différence significative n'apparaît entre les concentrations en microorganismes producteurs de biosurfactants des sols A et B excepté pour les pots inoculés avec *P. aeruginosa*, où la concentration en microorganismes producteurs de biosurfactants dans le sol B est supérieure (0,3 Log) à celle du sol A. Les travaux antérieurs ont montré que cette bactérie, qui produit des biosurfactants de type rhamnolipide, pouvait résister à une forte concentration en métaux grâce à ces métabolites, capables de piéger le métal (Miller 1995).

Seule l'inoculation avec *P. aeruginosa* est efficace, en particulier dans le sol B (**tableau III.14**). Bien que *B. subtilis* produise des biosurfactants de type surfactine (Arima *et al.* 1968), il semble qu'il n'ait pu se développer dans le sol de façon significative. Cette souche a en effet tendance à sporuler en cas de stress et à rester sous cette forme tant que les conditions ne sont pas favorables. Une étude sur la bioaugmentation de sols sablo-limoneux et de limons argileux avec *B. subtilis* a montré que la concentration en spores n'évoluait pas au cours du temps (van Elsas *et al.* 1986). Le passage d'un milieu de culture riche de type LB à un milieu oligotrophe tel que le sol, peut constituer un facteur de stress important amplifié par la prédation (van Veen *et al.* 1997).

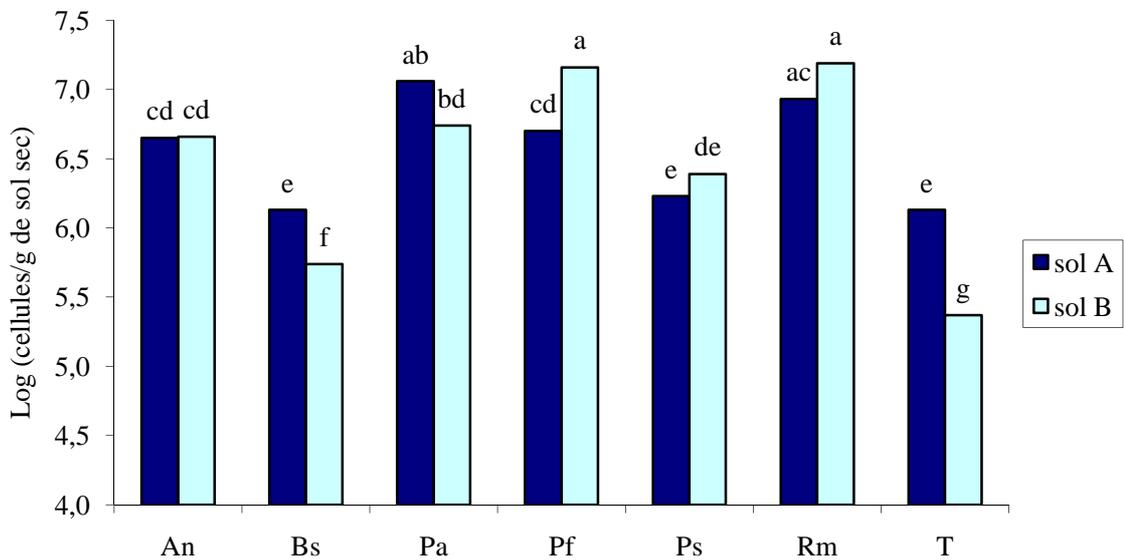
**Tableau III.14** : Ratio moyen de la concentration en microorganismes producteurs de biosurfactants (BioS)/concentration en microorganismes totaux (M), indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Ratio BioS/M	Sol A	Sol B
Témoin	0,007 (c)	0,007 (c)
<i>B. subtilis</i>	0,022 (c)	0,034 (c)
<i>P. aeruginosa</i>	0,277 (b)	0,495 (a)
<i>P. fluorescens</i>	0,011 (c)	0,006 (c)
<i>R. metallidurans</i>	0,015 (c)	0,006 (c)

### 2.2.3. Microorganismes producteurs de sidérophores

Les sols avec la plus forte concentration en microorganismes potentiellement producteurs de sidérophores sont ceux inoculés avec *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *R. metallidurans* (**figure 3.7**). Ces microorganismes sont en effet connus pour produire respectivement de la pyoverdine et de la pyochéline pour les *Pseudomonas* et de l'alcaligine E pour *R. metallidurans* (Diels *et al.* 1999; Meyer 2000).

La concentration en microorganismes producteurs de sidérophores varie de 5,4 à 7,2 Log (cellules/g de sol sec). Elle est nettement plus élevée que celle des autres producteurs de métabolites dont les concentrations varient de 4,2 à 6,5 Log (cellules/g de sol sec) pour les producteurs de biosurfactants, de 4,8 à 5,7 Log (cellules/g de sol sec) pour les producteurs d'acides organiques.



**Figure 3.7** : Concentration moyenne en microorganismes potentiellement producteurs de sidérophores, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé : An : *A. niger*, Bs : *B. subtilis*, Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Ps : *P. simplicissimum*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (sol non inoculé). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

La concentration maximale en microorganismes producteurs de sidérophores est atteinte à T1 pour les deux sols, puis diminue jusqu'à T3, excepté pour les sols inoculés avec *B. subtilis* (sol B) et le témoin non inoculé (sol A) (données non présentées).

L'augmentation du nombre de microorganismes producteurs de sidérophores dans le sol B par rapport au sol A avec *P. fluorescens* peut être le signe d'un mécanisme adaptatif de cette souche face à la toxicité métallique (Sharma *et al.* 2006). En revanche, la diminution du nombre

de microorganismes producteurs de sidérophores entre le sol A et le sol B pour *B. subtilis* et le témoin est peut-être due à la plus forte teneur en métaux dans le sol B, *B. subtilis* étant la souche parmi celles utilisées qui résiste le moins bien aux fortes concentrations métalliques (tableau II.8).

L'analyse du ratio comparant la concentration en microorganismes producteurs de sidérophores à celle de la microflore totale du sol (**tableau III.15**) montre que l'inoculation de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *R. metallidurans* pour les sols A et B est significativement efficace par rapport au témoin. Les autres modalités ne sont pas significativement différentes du témoin. Ces ratios prouvent que les microorganismes inoculés se sont développés ou bien que leur inoculation a stimulé la croissance d'autres microorganismes producteurs de sidérophores. Une étude de Guan *et al.* (2000) a en effet montré que l'ajout de pyoverdine et de pyochéline dans un milieu *in vitro* pouvait stimuler la croissance de *P. aeruginosa*. Les sidérophores produits par les inocula de *P. aeruginosa* ou *P. fluorescens* ont pu notamment être récupérés par d'autres *Pseudomonas* fluorescents du sol (Meyer *et al.* 1999) et/ou ont également pu stimuler la croissance d'autres genres, comme cela a été démontré pour *Bacillus polymyxa* (Chiarini *et al.* 1993).

**Tableau III.15** : Ratio moyen de la concentration en microorganismes producteurs de sidérophores (S)/concentration en microorganismes totaux (M), indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Ratio S/M	Sol A	Sol B
Témoin	0,187 (cd)	0,084 (d)
<i>A. niger</i>	0,263 (bc)	0,243 (bd)
<i>B. subtilis</i>	0,205 (bd)	0,109 (cd)
<i>P. aeruginosa</i>	0,680 (a)	0,625 (a)
<i>P. fluorescens</i>	0,357 (b)	0,571 (a)
<i>P. simplicissimum</i>	0,203 (bd)	0,199 (bd)
<i>R. metallidurans</i>	0,585 (a)	0,715 (a)

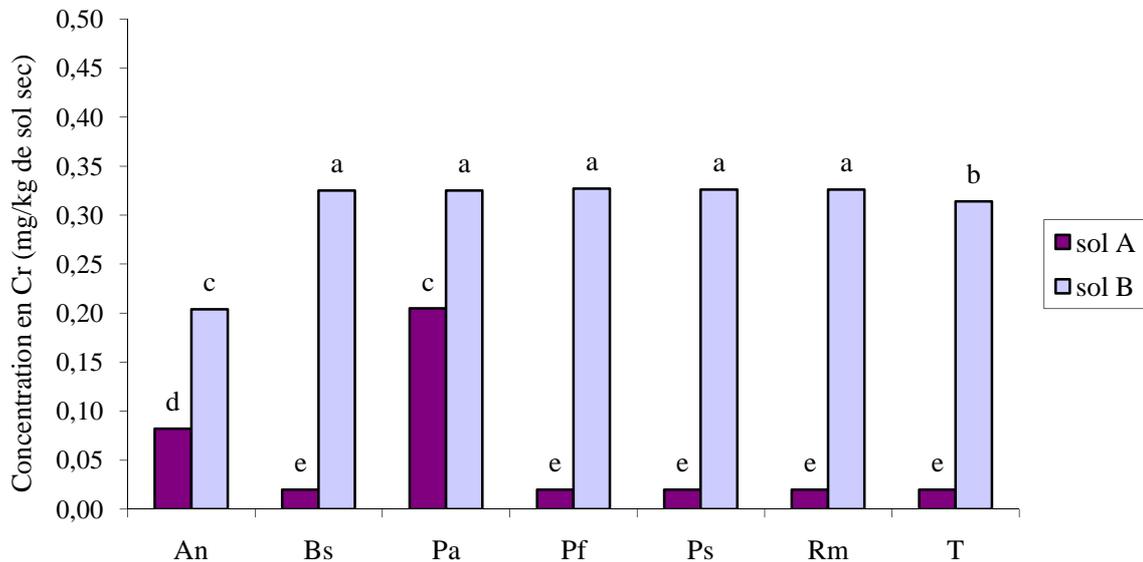


### 2.3. Spéciation métallique

L'analyse des fractions métalliques dans le sol a servi à évaluer l'impact de l'inoculation sur la bioaccessibilité des métaux dans le sol.

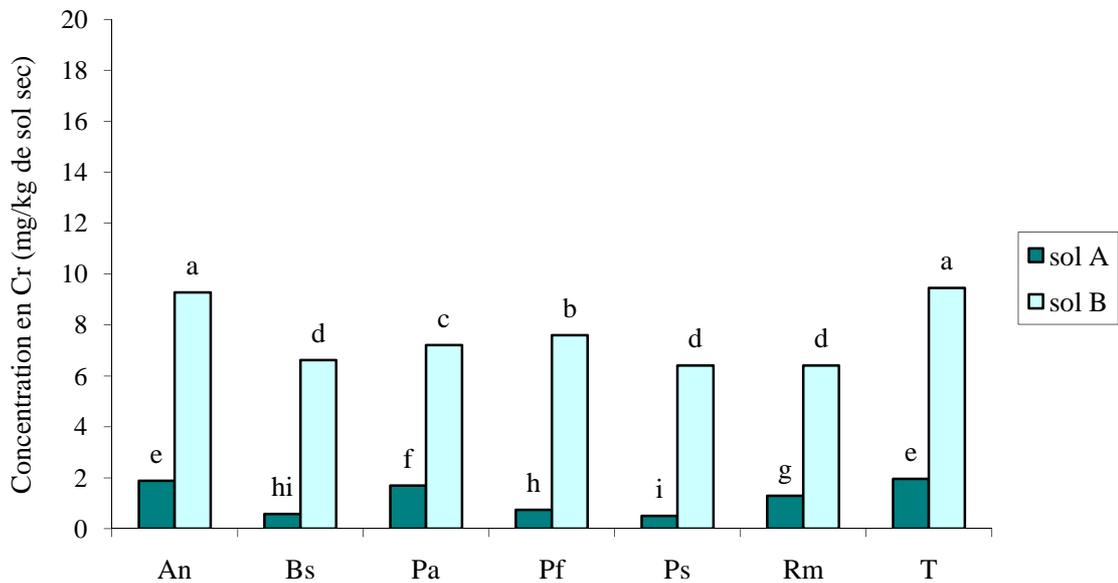
L'extraction séquentielle de Tessier (1979) permet d'extraire en moyenne 84% du Pb et 95% du Cr pour le sol A et 91% du Pb et 74% du Cr pour le sol B. Les différents microorganismes inoculés n'ont pas d'impact significatif sur le rendement d'extraction des métaux. Les fractions F1 (échangeable) et F2 (liées aux carbonates) renseignent sur la bioaccessibilité des métaux dans les fractions les plus mobiles (Adriano 1986; Xian 1989).

Suite à l'inoculation des microorganismes, les teneurs en Cr de la fraction F1 du sol B augmentent significativement par rapport au témoin (non inoculé), excepté pour le sol inoculé avec *A. niger*. Par contre, celles du sol A ne sont supérieures au témoin qu'avec *A. niger* et *P. aeruginosa* (**figure 3.8**). Globalement, la concentration en Cr dans la fraction F1 diminue entre T0 et T3, quel que soit le sol et le microorganisme inoculé (données non présentées). Les mécanismes en jeu sont à la fois une biosorption des métaux sur la paroi des microorganismes par adsorption passive et/ou accumulation dans les cellules (López *et al.* 2000) et une augmentation de la mobilité des métaux dans le sol sous l'action de métabolites, en particulier microbiens (acides organiques, biosurfactants, sidérophores). Ainsi, selon que le mécanisme prépondérant est la biosorption ou la mobilisation, les teneurs en métaux dans les fractions bioaccessibles diminuent ou augmentent.



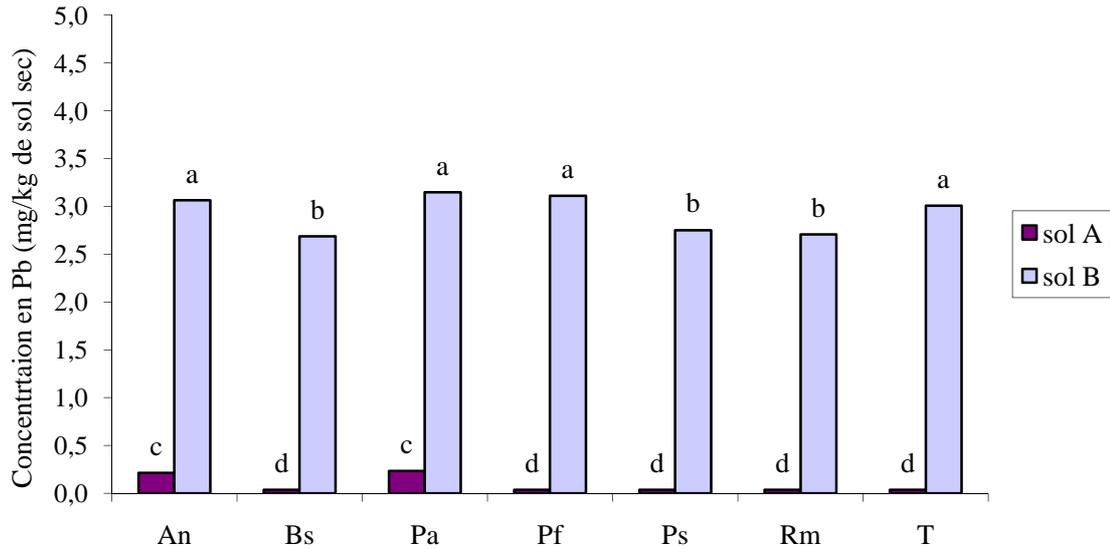
**Figure 3.8** : Concentration moyenne en Cr dans la fraction F1, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé : An : *A. niger*, Bs : *B. subtilis*, Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Ps : *P. simplicissimum*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (sol non inoculé). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Le facteur inoculation tend globalement à diminuer les teneurs en Cr dans la fraction F2 (métaux liés aux carbonates) par rapport au témoin, excepté pour *A. niger* dans les deux sols (**figure 3.9**). Cette diminution pour le sol B peut s'expliquer par un transfert d'une partie des métaux vers la fraction F1 mais également vers les autres fractions non résiduelles, c'est à dire F3 et F4. En effet, l'augmentation en Cr dans la fraction F1, en moyenne de 0,012 mg/kg de sol sec par rapport au témoin, ne peut expliquer à elle seule la diminution en Cr observée pour la fraction F2, en moyenne de 2,6 mg/kg de sol sec par rapport au témoin. Cette réduction de la teneur en Cr dans la fraction F2 des sols A et B au cours du temps (T0 à T3) s'observe également pour le témoin (données non présentées).



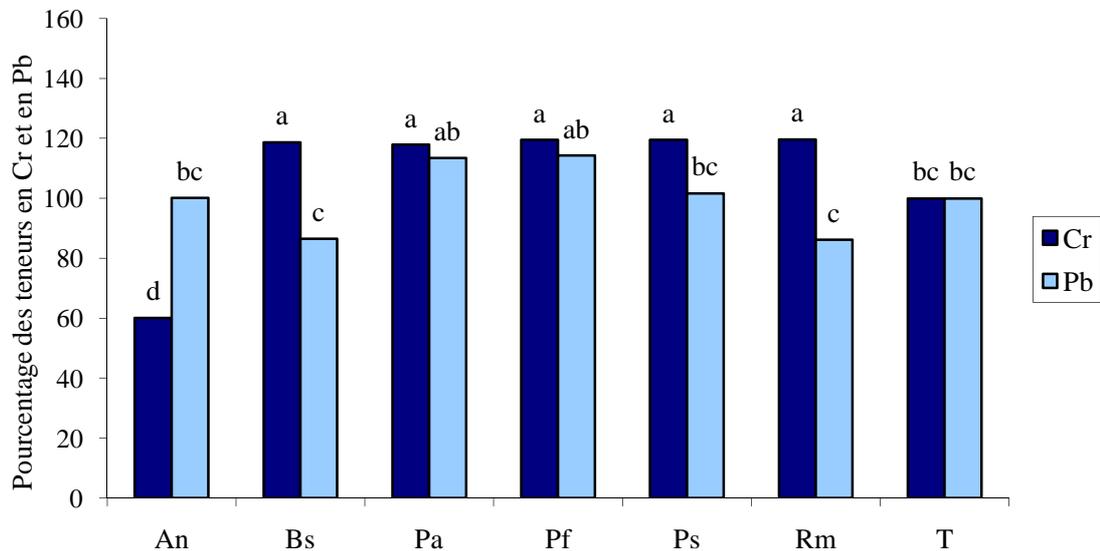
**Figure 3.9** : Concentration moyenne en Cr dans la fraction F2, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé : An : *A. niger*, Bs : *B. subtilis*, Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Ps : *P. simplicissimum*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (sol non inoculé). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Concernant le Pb, l'inoculation du sol A avec *A. niger* ou *P. aeruginosa* augmente sa teneur dans F1 par rapport au témoin. Par contre aucun microorganisme ne permet d'augmenter la concentration en Pb de la fraction F1 du sol B ; l'inoculation des pots de sol avec *B. subtilis*, *P. simplicissimum* et *R. metallidurans* entraînant même une diminution de cette concentration (**figure 3.10**). Les teneurs en Pb de la fraction F1 diminuent progressivement entre T0 et T3 pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment.



**Figure 3.10** : Concentration moyenne en Pb dans la fraction F1, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé : An : *A. niger*, Bs : *B. subtilis*, Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Ps : *P. simplicissimum*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (sol non inoculé). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

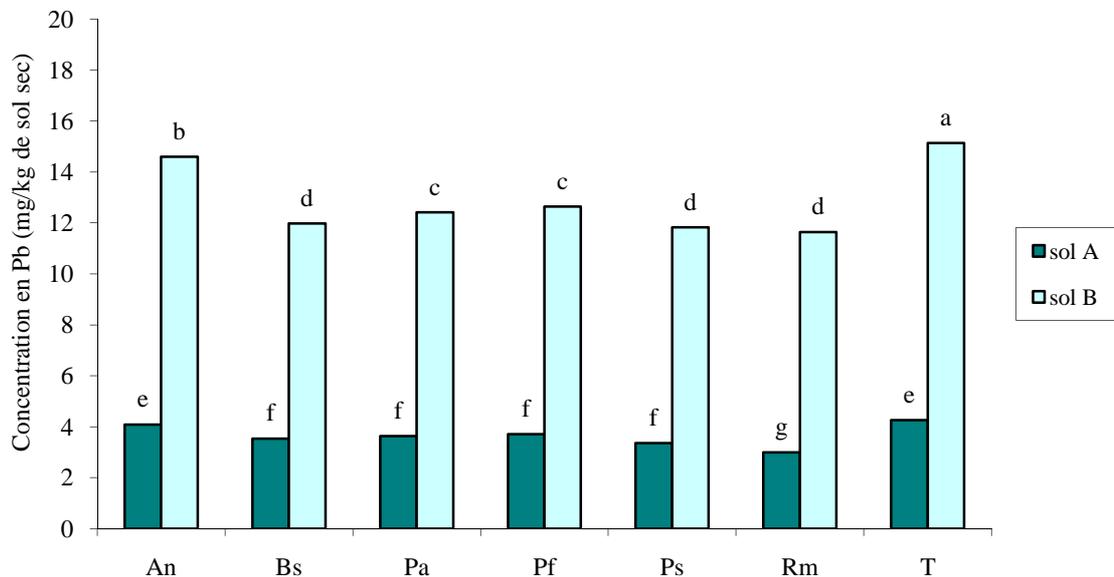
Après 3 semaines d'incubation, l'analyse des teneurs en métaux du sol B montre que l'inoculation avec *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. simplicissimum* ou *R. metallidurans*, augmente de 17 à 19 % les teneurs en Cr dans F1, alors que l'inoculation avec *A. niger* diminue Cr F1 de 40 % par rapport au témoin (**figure 3.11**).



**Figure 3.11** : Pourcentage des teneurs en Cr et Pb dans les fraction F1 du sol B par rapport aux teneurs dans le témoin, au temps T=3 semaines, en fonction du type de microorganisme inoculé : An : *A. niger*, Bs : *B. subtilis*, Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Ps : *P. simplicissimum*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (sol non inoculé).. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Pour le Pb dans la fraction F1 du sol B (**figure 3.11**), aucune différence significative n'est observée bien que l'inoculation avec *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* augmente de 13 et 14 % respectivement les teneurs en Pb dans F1 par rapport au témoin. Ces deux bactéries produisent des pyochélines, qui possèdent une affinité élevée pour les ions divalents (Cuppels *et al.* 1987; Visca *et al.* 1992) et des pyoverdines qui forment des complexes avec les ions trivalents tel que CrIII (Budzikiewicz, 1997). La formation des complexes métalliques, en particulier entre le CrIII et la pyoverdine, peut être assez lente et peut nécessiter plusieurs jours, ce qui peut expliquer le décalage observé *in vivo* entre le pic de croissance des microorganismes producteurs de sidérophores à T1 et l'effet sur la spéciation des métaux observable à T3, à supposer que les sidérophores soient les métabolites responsables de cette évolution (Budzikiewicz 1997). Il faut également noter que d'autres métaux peuvent interagir avec les sidérophores et sont fortement présents dans les fractions F1 et F2 du sol B (tableau III.4). C'est le cas de Al (13 mg/kg sol), Cu (2,2 mg/kg sol), Fe (4,1 mg/kg sol) et Zn (16,2 mg/kg sol). La présence de ces métaux, pouvant potentiellement se lier aux sidérophores dans la solution de sol, pourrait expliquer les résultats non significatifs obtenus pour le sol B avec Cr et Pb, du fait de la compétition de ces métaux pour les sidérophores.

De la même façon que pour le Cr, la teneur en Pb dans la fraction F2 diminue dans les sols inoculés par rapport au témoin pour les sols A et B, excepté pour *A. niger* dans le sol A (**figure 3.12**).



**Figure 3.12** : Concentration moyenne en Pb dans la fraction F2, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé : An : *A. niger*, Bs : *B. subtilis*, Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Ps : *P. simplicissimum*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (sol non inoculé). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

L'inoculation des sols A et B a pour effet soit de diminuer les teneurs en Cr dans les fractions F3 (fraction liés aux oxydes métalliques) et F5 (fraction résiduelle), soit n'a pas d'effet significatif par rapport au témoin (**tableaux III.16 et III.17**). En revanche pour la fraction F4 (fraction liée à la matière organique), tous les sols inoculés A ou B ont une teneur en métaux supérieure à celle du témoin. Pour le sol A cette augmentation est en moyenne de 1,6 mg/kg sol sec et est identique quel que soit le microorganisme. Pour le sol B, cette augmentation varie de 3,5 mg/kg sol sec pour *A. niger* à 10,9 mg/kg sol sec pour *P. aeruginosa*. La fraction F4 représente les métaux soit complexés par la matière organique et les sulfures du sol, soit bioaccumulés dans les organismes vivants (Filgueiras *et al.* 2002). L'augmentation observée pour le Cr de la fraction F4 par rapport au témoin, pourrait être due à une éventuelle incorporation du Cr par les microorganismes inoculés.

**Tableau III.16** : Concentration moyenne en Cr (mg/kg sol sec) dans les fractions F3, F4 et F5 du sol A, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

[Cr] (mg/kg sol sec)	F3	F4	F5
Témoin	15,71 (a)	33,34 (b')	104,14 (a'')
<i>A. niger</i>	15,33 (ab)	35,23 (a')	99,05 (b'')
<i>B. subtilis</i>	14,90 (b)	34,80 (a')	102,57 (a''b'')
<i>P. aeruginosa</i>	15,04 (ab)	34,98 (a')	102,79 (a''b'')
<i>P. fluorescens</i>	15,73 (a)	35,05 (a')	102,01 (a''b'')
<i>P. simplicissimum</i>	15,65 (a)	35,35 (a')	100,01 (a''b'')
<i>R. metallidurans</i>	14,68 (b)	34,25 (a')	101,33 (a''b'')

**Tableau III.17** : Concentration moyenne en Cr (mg/kg sol sec) dans les fractions F3, F4 et F5 du sol B, indépendamment du temps, en fonction du type de microorganisme inoculé. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

[Cr] (mg/kg sol sec)	F3	F4	F5
Témoin	148,87 (a)	149,60 (d')	130,21 (a'')
<i>A. niger</i>	145,28 (b)	153,08 (c')	126,23 (a''b'')
<i>B. subtilis</i>	138,02 (c)	154,11 (b'c')	129,83 (a'')
<i>P. aeruginosa</i>	138,95 (c)	160,52 (a')	123,67 (b'')
<i>P. fluorescens</i>	148,87 (a)	155,84 (b'c')	124,28 (b'')
<i>P. simplicissimum</i>	145,28 (b)	157,14 (b')	124,57 (b'')
<i>R. metallidurans</i>	143,72 (b)	156,26 (b'c')	125,70 (a''b'')

La concentration en Pb dans les fractions F3, F4 et F5 diminue ou n'est pas significativement différente du témoin, quel que soit le sol et le microorganisme inoculé (**tableaux III.18 et III.19**). Le Pb est en effet l'un des métaux les moins mobiles du sol avec un Kd (coefficient de distribution sol/solution de sol) médian de 102410 L/kg, alors que le Kd médian du Cr est de 4778 L/kg (Sauve *et al.* 2000).

**Tableau III.18** : Concentration moyenne en Pb (mg/kg sol sec) dans les fractions F3, F4 et F5 du sol A, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

[Pb] (mg/kg sol sec)	F3	F4	F5
Témoin	25,16 (ab)	14,90 (a'c')	42,35 (a'')
<i>A. niger</i>	25,19 (ab)	15,11 (a')	42,77 (a'')
<i>B. subtilis</i>	24,70 (ab)	14,61 (c'd')	42,80 (a'')
<i>P. aeruginosa</i>	24,34 (b)	15,03 (a'b')	42,40 (a'')
<i>P. fluorescens</i>	25,94 (a)	14,73 (b'd')	42,36 (a'')
<i>P. simplicissimum</i>	25,84 (a)	14,57 (c'd')	42,42 (a'')
<i>R. metallidurans</i>	25,38 (ab)	14,52 (d')	42,05 (a'')

**Tableau III.19** : Concentration moyenne en Pb (mg/kg sol sec) dans les fractions F3, F4 et F5 du sol B, indépendamment du facteur temps, en fonction du type de microorganisme inoculé. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

[Pb] (mg/kg sol sec)	F3	F4	F5
Témoin	102,56 (a)	51,97 (a'b')	109,15 (a''b'')
<i>A. niger</i>	99,27 (b)	51,57 (a'b')	109,70 (a''b'')
<i>B. subtilis</i>	95,93 (c)	51,70 (a'b')	109,07 (a''c'')
<i>P. aeruginosa</i>	97,10 (bc)	50,11 (b')	106,65 (b'')
<i>P. fluorescens</i>	101,93 (a)	52,22 (a')	111,91 (a'')
<i>P. simplicissimum</i>	102,41 (a)	51,13 (a'c')	106,85 (b''c'')
<i>R. metallidurans</i>	104,51 (a)	50,52 (a'c')	111,07 (a''b'')

**Tableau III.20** : Matrice de corrélation des coefficients de Pearson pour les sols A et B (en gras, valeurs significatives au seuil  $\alpha=0,05$ ). AO, B, S : microorganismes producteurs d'acides organiques, biosurfactants ou sidérophores.

Sol A / Sol B	Cr F1	Cr F2	Cr F3	Cr F4	Cr F5	Pb F1	Pb F2	Pb F3	Pb F4	Pb F5	S	B	AO	pH	Eh
Cr F1		<b>0,496</b>	0,009	0,025	0,156	<b>0,847</b>	0,181	0,069	-0,011	0,094	<b>0,497</b>	<b>0,534</b>	<b>-0,337</b>	-0,043	<b>-0,328</b>
Cr F2	<b>0,441</b>		0,195	<b>-0,420</b>	<b>0,271</b>	<b>0,584</b>	<b>0,608</b>	<b>0,244</b>	-0,123	0,168	0,208	0,000	-0,178	-0,031	<b>-0,552</b>
Cr F3	0,034	<b>0,456</b>		<b>-0,372</b>	<b>0,490</b>	0,065	<b>0,446</b>	<b>0,758</b>	<b>-0,578</b>	0,193	<b>-0,229</b>	<b>-0,400</b>	0,034	<b>-0,349</b>	<b>-0,292</b>
Cr F4	<b>0,270</b>	<b>-0,335</b>	<b>-0,373</b>		<b>-0,465</b>	-0,011	<b>-0,461</b>	<b>-0,582</b>	<b>0,708</b>	<b>-0,501</b>	0,200	0,155	0,109	<b>0,302</b>	<b>0,324</b>
Cr F5	0,189	<b>0,416</b>	0,186	0,113		0,149	<b>0,244</b>	<b>0,745</b>	<b>-0,691</b>	<b>0,267</b>	-0,139	-0,091	-0,121	<b>-0,674</b>	-0,197
Pb F1	-0,071	<b>0,586</b>	0,185	0,105	<b>0,404</b>		<b>0,331</b>	0,138	-0,033	0,172	<b>0,404</b>	0,197	-0,150	-0,014	<b>-0,394</b>
Pb F2	<b>-0,552</b>	<b>0,504</b>	0,188	<b>-0,407</b>	<b>-0,383</b>	0,013		<b>0,284</b>	-0,197	<b>0,317</b>	<b>-0,270</b>	<b>-0,290</b>	0,200	0,012	<b>-0,650</b>
Pb F3	<b>0,244</b>	<b>0,384</b>	<b>0,367</b>	0,160	<b>0,823</b>	<b>0,418</b>	<b>-0,512</b>		<b>-0,899</b>	<b>0,374</b>	-0,165	<b>-0,396</b>	-0,110	<b>-0,585</b>	-0,161
Pb F4	-0,186	-0,104	-0,037	<b>-0,016</b>	<b>-0,402</b>	<b>-0,266</b>	<b>0,488</b>	<b>-0,563</b>		<b>-0,425</b>	<b>0,216</b>	<b>0,285</b>	0,107	<b>0,527</b>	0,080
Pb F5	-0,008	0,037	0,165	-0,125	-0,019	0,090	0,050	-0,023	0,039		-0,195	-0,143	-0,002	0,007	-0,177
S	-0,162	<b>-0,399</b>	-0,073	0,201	<b>-0,656</b>	-0,189	0,063	<b>-0,467</b>	0,136	0,134		<b>0,528</b>	<b>-0,586</b>	0,086	0,079
B	<b>0,283</b>	<b>-0,393</b>	<b>-0,505</b>	<b>0,305</b>	<b>-0,363</b>	0,045	-0,070	<b>-0,436</b>	0,017	-0,061	<b>0,310</b>		<b>-0,498</b>	0,033	0,020
AO	<b>-0,285</b>	0,078	-0,073	<b>-0,357</b>	-0,050	<b>-0,356</b>	<b>0,311</b>	<b>-0,263</b>	<b>0,224</b>	-0,128	<b>-0,326</b>	<b>-0,435</b>		0,044	-0,134
pH	<b>-0,370</b>	0,182	0,039	-0,155	-0,066	-0,067	0,185	0,038	0,044	-0,159	-0,059	<b>-0,271</b>	0,022		-0,079
Eh	<b>0,234</b>	<b>-0,327</b>	<b>-0,228</b>	-0,071	-0,164	<b>-0,282</b>	-0,038	<b>-0,233</b>	0,151	<b>0,276</b>	0,028	0,141	0,166	<b>-0,257</b>	

## 2.4. Analyse globale des facteurs régissant la phytoextraction des métaux

La matrice de corrélation (**tableau III.20**) met en évidence les relations existantes entre les différents paramètres étudiés. Les valeurs des coefficients de corrélation discutées ci-dessous sont surlignées en bleu dans le tableau. Pour le sol A, les teneurs en Cr et Pb de la fraction F1 sont positivement corrélées entre elles (0,847) ; de même pour F2 (0,608), F3 (0,758), F4 (0,708) et F5 (0,267). Pour le sol B cette observation est vraie dans F2 (0,504) et F3 (0,367). Les teneurs en Cr et Pb dans le sol ont donc une mobilité comparable.

Dans le sol A, le nombre de microorganismes producteurs de sidérophores influence positivement sur les concentrations en Cr de la fraction F1 (0,497), Pb de F1 (0,404) et Pb de F4 (0,216). La même conclusion s'applique au nombre de microorganismes producteurs de biosurfactants corrélé au Cr de la fraction F1 (0,534) et au Pb de F4 (0,285) ; le nombre de microorganismes producteurs de biosurfactants étant par ailleurs positivement corrélé à celui des microorganismes producteurs de sidérophores (0,528). Inversement les concentrations en microorganismes producteurs d'acides organiques sont corrélées négativement à celles du Cr dans la fraction F1 (-0,337) ainsi qu'au nombre de microorganismes producteurs de biosurfactants (-0,498) et de sidérophores (-0,586). L'inoculation de microorganismes producteurs de sidérophores a donc un impact positif et significatif sur les teneurs en Cr et en Pb de la fraction F1, c'est à dire la fraction la plus mobile. L'effet positif obtenu pour les producteurs de biosurfactants pour Pb dans la fraction F1 est probablement dû à l'inoculation du sol A avec *P. aeruginosa*.

Pour le sol B, le nombre de microorganismes producteurs de sidérophores n'est corrélé positivement à aucune des fractions métalliques de Cr ou de Pb. Le nombre de microorganismes producteurs de biosurfactants est corrélé positivement à la teneur en Cr de la fraction F1 (0,283) et F4 (0,305), ce qui est néanmoins inférieur aux coefficients obtenus pour le sol A. Enfin le nombre de microorganismes producteurs d'acides organiques est corrélé positivement à la teneur en Pb dans la fraction F2 (0,311) et F4 (0,224).

Une des facteurs les plus importants de la mobilité des métaux est le pH, dont la diminution augmente la solubilité des métaux (Chuan *et al.* 1996). Cependant ce paramètre ne semble pas lié à la mobilité des métaux pour notre étude car il n'y a pas de corrélation significative entre le pH et les métaux dans les fractions les plus mobiles (F1 et F2) pour le sol A. En revanche, il faut noter que le Cr dans la fraction F1 du sol est corrélé négativement au pH du sol (-0,370).



Une deuxième paramètre essentiel qui peut jouer sur la mobilité des métaux est le potentiel rédox Eh, qui influe sur la dissolution des oxy-hydroxydes métalliques du sol en conditions réductrices, donc quand Eh est faible (Lee et Saunders 2003). Pour notre étude, Eh semble avoir un léger impact négatif sur les fractions liées aux oxydes métalliques (F3) pour Cr dans le sol A (-0, 292) et pour Cr et Pb dans le sol B (-0,288 et -0, 233).

## **CONCLUSION**

L'inoculation des sols avec *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *R. metallidurans*, augmente de façon significative le nombre de microorganismes potentiellement producteurs de sidérophores dans le sol. Ces microorganismes sont les plus nombreux dans les deux sols A et B comparativement aux microorganismes producteurs d'acides organiques et de biosurfactants. La densité de population est l'un des facteurs clés pour la colonisation du sol et de la rhizosphère, c'est pourquoi ces microorganismes semblent intéressants pour la bioaugmentation du sol (Duquenne *et al.* 1996; van Veen *et al.* 1997).

Globalement la quantité de Cr et Pb potentiellement biodisponible dans les deux sols est assez faible, ce qui a été observé dans plusieurs études (Banks *et al.* 2006; Hu *et al.* 2006) et peut être due à la forte teneur en matière organique de nos deux sols ou à la teneur élevée en phosphates, en particulier dans le sol B. Les phosphates peuvent en effet contribuer à l'immobilisation de Pb dans le sol en le précipitant sous forme d'hydroxyapatite (Seaman *et al.* 2001).

Bien que les facteurs de corrélation calculés soient assez faible dans l'ensemble, la concentration en microorganismes producteurs de sidérophores (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *R. metallidurans*) est corrélée positivement à la mobilité du Cr et du Pb dans la fraction échangeable (F1 et F2) du sol A. La corrélation positive observée dans le sol A entre la concentration en microorganismes producteurs de biosurfactants et la teneur en métaux dans F1 est probablement due à la bioaugmentation de *P. aeruginosa* et non à celle de *B. subtilis*. L'effet de la bioaugmentation dans le sol B a un effet moindre sur la mobilité des métaux contrairement au sol A, bien qu'une légère augmentation de la teneur en Cr et Pb dans les fractions F1 et F2 ait été observée après bioaugmentation avec *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*.

L'objectif de cette étude étant d'augmenter la mobilité des métaux, nous avons choisi d'optimiser la bioaugmentation du sol avec les microorganismes producteurs de sidérophores. Nous avons démontré en effet que ceux-ci pouvaient coloniser efficacement le sol en particulier les *Pseudomonas* et que la production de sidérophores pouvait augmenter la mobilité des métaux.

### 3. Optimisation de la production de sidérophores

Dans le but d'optimiser la production de sidérophores par les microorganismes sélectionnés, notamment les *Pseudomonas* (chapitre 2), différentes modalités d'inoculation ont été testées afin d'augmenter à la fois la croissance des microorganismes et la production de sidérophores. Différents substrats ont été testés tout d'abord dans un milieu sans métaux puis dans un milieu contenant des métaux avec ou sans Fe. Enfin, l'effet de l'immobilisation des cellules dans des billes de Ca-alginate avec ou sans lait écrémé a également été testée.

#### 3.1. Influence de la source carbonée sur la production de sidérophores.

Les substrats carbonés utilisés dans cette étude sont des substrats simples (fructose, glucose, glycérol, lactose, mannitol, sucrose) ou complexes (amidon, lait écrémé), ajoutés soit à 0,67 g/L ou à 6,7 g/L au milieu.

La concentration cellulaire des deux bactéries, inoculées initialement à raison de  $6,7 \cdot 10^7$  cellules/mL, est supérieure au témoin (milieu inoculé sans substrat) en présence de fructose, glucose, glycérol et de mannitol, ainsi qu'avec le lait écrémé à 6,7 g/L pour *P. aeruginosa* (**tableau III.21**). Certains substrats n'ont pas d'effets significatifs comme l'amidon pour *P. fluorescens*, le lactose et le sucrose pour les deux bactéries excepté à la concentration 6,7 g/L pour *P. fluorescens*. Le lait écrémé réduit la croissance bactérienne de *P. fluorescens* ou n'a pas d'effet à 0,67 g/L.

**Tableau III.21** : Concentrations cellulaires moyennes (cellules/mL) de *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* en fonction des différents substrats et de leur concentration dans le milieu, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupements homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

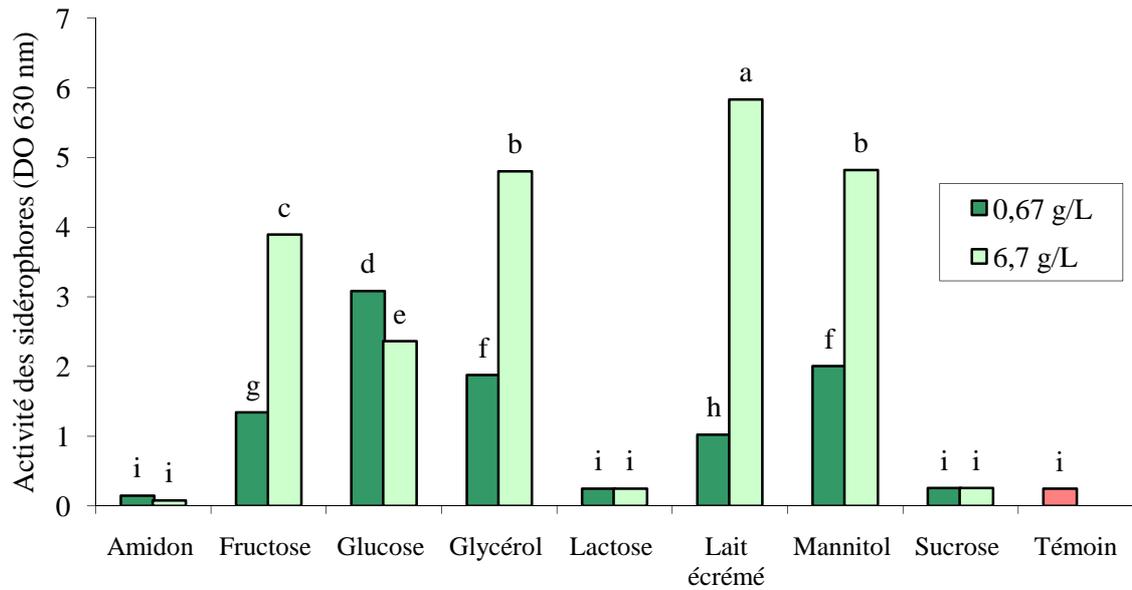
Concentration en substrat	<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. fluorescens</i>	
	0,67 g/L	6,7 g/L	0,67 g/L	6,7 g/L
Témoin	$2,68 \cdot 10^8$ (g)		$1,81 \cdot 10^8$ (e')	
Amidon	$3,39 \cdot 10^8$ (e)	$3,48 \cdot 10^8$ (e)	$1,68 \cdot 10^8$ (e')	$1,84 \cdot 10^8$ (e')
Fructose	$4,16 \cdot 10^8$ (d)	$1,04 \cdot 10^9$ (a)	$3,42 \cdot 10^8$ (d')	$3,32 \cdot 10^8$ (d')
Glucose	$3,22 \cdot 10^8$ (f)	$9,73 \cdot 10^8$ (e)	$3,57 \cdot 10^8$ (d')	$6,07 \cdot 10^8$ (b')
Glycérol	$3,58 \cdot 10^8$ (e)	$1,06 \cdot 10^9$ (b)	$3,27 \cdot 10^8$ (d')	$4,26 \cdot 10^8$ (c')
Lactose	$2,87 \cdot 10^8$ (fg)	$2,54 \cdot 10^8$ (g)	$1,71 \cdot 10^8$ (e')	$1,83 \cdot 10^8$ (e')
Lait écrémé	$3,08 \cdot 10^8$ (eg)	$6,12 \cdot 10^8$ (c)	$1,23 \cdot 10^8$ (e')	$6,96 \cdot 10^7$ (f')
Mannitol	$4,08 \cdot 10^8$ (d)	$9,98 \cdot 10^8$ (b)	$3,35 \cdot 10^8$ (d')	$6,80 \cdot 10^8$ (a')
Sucrose	$2,63 \cdot 10^8$ (g)	$2,55 \cdot 10^8$ (g)	$1,95 \cdot 10^8$ (e')	$3,24 \cdot 10^8$ (d')

Les substrats les plus efficaces sont le fructose à 6,7 g/L pour *P. aeruginosa* ( $1,04 \cdot 10^9$  cellules/mL) et le mannitol à 6,7 g/L pour *P. fluorescens* ( $6,80 \cdot 10^8$  cellules/mL). Globalement les substrats ajoutés à forte concentration augmentent de façon plus importante la croissance des bactéries.

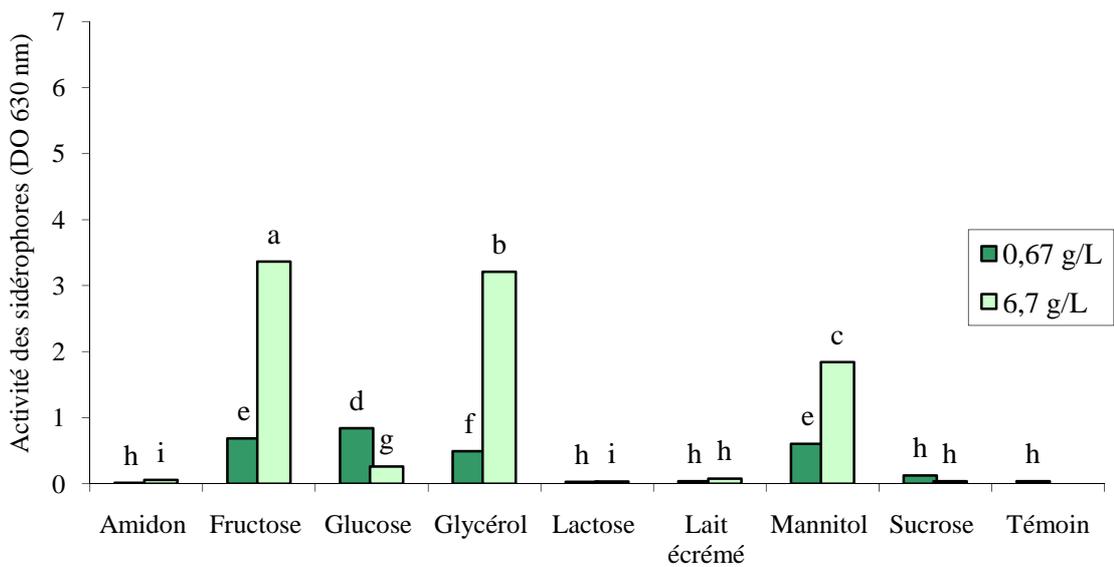
Les sidérophores sont des métabolites secondaires produits généralement en fin de phase exponentielle de croissance (Payne et Virginia 1994). Dans notre étude, la production maximale de sidérophores par *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* est atteinte entre 24 et 72 h pour le témoin ou pour les faibles concentrations en substrats (0,67 g/L) puis diminue jusqu'à 8 j, le substrat étant devenu limitant (données non présentées). En revanche, en présence de substrats à concentration élevée (6,7 g/L), la production maximale est atteinte plus tardivement, au bout de 4j à 8j. Les substrats qui augmentent la production de sidérophores sont ceux dont la concentration dans le milieu est la plus élevée (6,7 g /L) (**figures 3.13 et 3.14**):

- pour *P. aeruginosa* : lait écrémé > mannitol > glycérol > fructose > glucose;
- pour *P. fluorescens* : fructose > glycérol > mannitol > glucose.

Par exemple l'ajout de lait écrémé pour *P. aeruginosa* ou de fructose pour *P. fluorescens* à 6,7 g/L, augmente 6 fois l'activité des sidérophores par rapport aux mêmes substrats ajoutés en faible concentration (0,67 g/L). L'action stimulante du lait écrémé n'est pas due à la présence de lactose, mais probablement à la caséine, le principal composé phosphoprotéique du lait écrémé. Cette protéine a pour propriété de piéger le fer par chélation, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de production de sidérophores par *P. aeruginosa* dans ce milieu (Carmichael *et al.* 1975). Par ailleurs, durant le processus de stérilisation du lait écrémé, une partie du lactose peut se décomposer en galactose et glucose, ce qui peut contribuer également à augmenter la production de sidérophores. L'ajout d'amidon, de lactose ou de sucrose n'a pas d'effet significatif sur l'activité des sidérophores, de même que le lait écrémé pour *P. fluorescens*. Enfin, un effet « répressif » est observé avec le glucose où l'activité des sidérophores produits par *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* dans le milieu à 6,7 g/L est respectivement 1,3 et 3,2 fois inférieure à celle observée avec 0,67 g de glucose/L. Cette diminution peut être liée au pH du milieu qui diminue jusqu'à 5,3 pour *P. aeruginosa* et 4,3 pour *P. fluorescens* au bout de 8j dans le milieu avec 6,7 g/L de glucose alors qu'avec la concentration à 0,67 g/L le pH du milieu de culture en fin d'expérience est compris entre 6,5 et 8,0, de même que pour les milieux avec les autres substrats. Cette acidification peut être à l'origine de la dégradation des sidérophores au cours du temps (Budzikiewicz 1993).

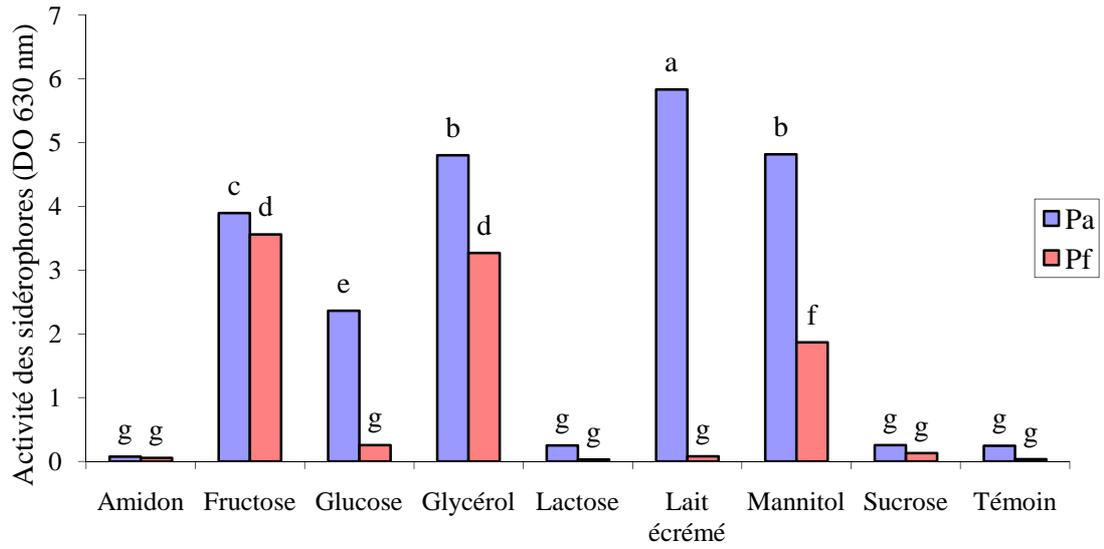


**Figure 3.13** : Activité moyenne des sidérophores produits par *P. aeruginosa* en fonction du substrat carboné et de sa concentration, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA.



**Figure 3.14** : Activité moyenne des sidérophores produits par *P. fluorescens* en fonction du substrat carboné et de sa concentration, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA.

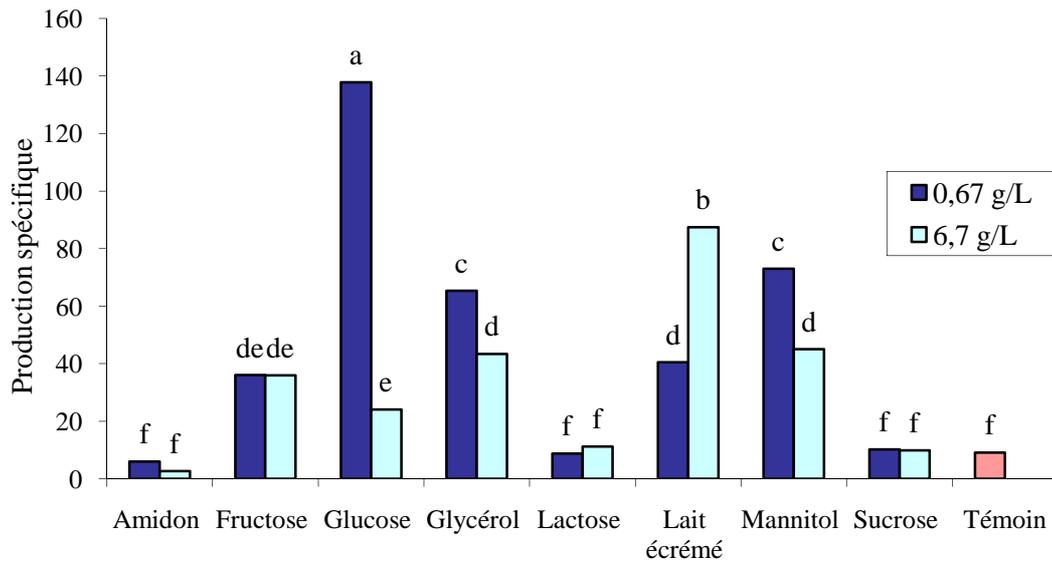
L'activité des sidérophores produits par *P. aeruginosa* est supérieure à celle de *P. fluorescens*, quel que soit le substrat (**figure 3.15**). Cette activité plus élevée peut être due soit à une augmentation de la quantité et donc de la production de sidérophores, soit à une modification de la proportion de pyoverdine et de pyochéline ayant des affinités différentes pour le FeIII, et dont les constantes de stabilité sont respectivement de  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  (Albrecht-Gary *et al.* 1994) et  $2.10^5 \text{ M}^{-1}$  (Cox *et al.* 1981). La nature des sidérophores produits est en effet susceptible de varier en fonction du milieu mais également en fonction de la souche productrice.



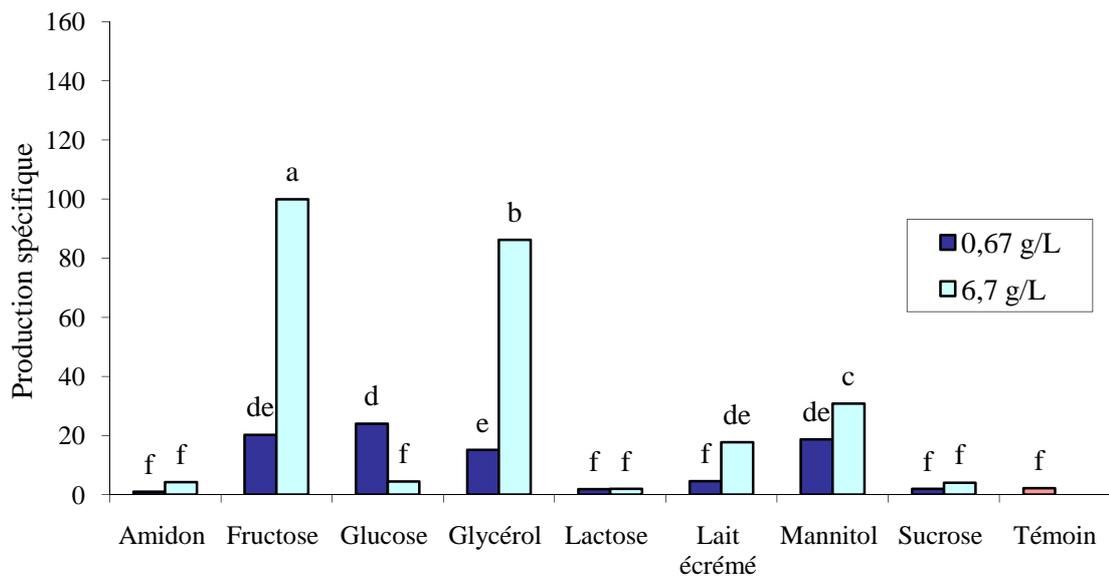
**Figure 3.15** : Activité moyenne des sidérophores produits par *P. aeruginosa* (Pa) et *P. fluorescens* (Pf) en fonction des différents substrats (6,7 g/L), indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Les résultats montrent que les substrats les plus intéressants pour l'activité des sidérophores sont le lait écrémé pour *P. aeruginosa* et le fructose pour *P. fluorescens*, tous deux à 6,7 g/L. Ces deux substrats augmentent l'activité des sidérophores respectivement de 18 et 84 fois par rapport au témoin. Quelques études ont montré que des sucres simples tel que le glucose pouvaient stimuler la production de sidérophores par *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* (Díaz de Villegas *et al.* 2002; Duffy et Defago 1999). D'autres sucres tel que le fructose ou le mannitol peuvent augmenter la production de pyochéline mais pas le sucrose ni le glycérol selon Duffy et Defago (1999).

La production spécifique (activité des sidérophores rapportée à la biomasse microbienne) donne une indication sur la production réelle des sidérophores. Les substrats qui augmentent la production spécifique de sidérophores chez *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* sont le fructose, le glucose, le glycérol, le lait écrémé et le mannitol (figures 3.16 et 3.17).



**Figure 3.16** : Production spécifique moyenne des sidérophores par *P. aeruginosa* en fonction du substrat carboné et de sa concentration, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.



**Figure 3.17** : Production spécifique moyenne des sidérophores par *P. fluorescens* en fonction du substrat carboné et de sa concentration, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

L'amidon, le lactose, le sucrose ainsi que le glucose à 6,7 g/L et le lait écrémé à 0,67 g/L pour *P. fluorescens* n'augmentent pas significativement la production spécifique par rapport au témoin.

Pour les substrats simples, la faible concentration en substrat (0,67 g/L) augmente significativement cette production spécifique par rapport à la forte concentration alors que pour le lait écrémé, l'effet inverse est observé. Les protéines du lait écrémé ayant la particularité de piéger le Fe, l'augmentation de la concentration en substrat a peut-être appauvri le milieu en Fe et a pu stimuler la quantité de sidérophores produits par cellule bactérienne.

L'activité des sidérophores est corrélée significativement à la concentration cellulaire en particulier pour *P. aeruginosa* (**tableau III.22**). La production des sidérophores n'est pas seulement régulée par la teneur en Fe du milieu mais également par les conditions du milieu, la production d'autres métabolites secondaires, la variation de phase et le quorum sensing (Cornelis et Matthijs 2002). En effet, la synthèse de la pyoverdine par *P. aeruginosa* est induite par des molécules signal de type homosérine lactones, et est liée aux gènes du quorum sensing (Stintzi *et al.* 1998; Whiteley *et al.* 1999). Cette induction peut expliquer la synthèse accrue des sidérophores pour les fortes densités cellulaires. De plus, l'augmentation de la taille de la population augmente également statistiquement les chances des cellules bactériennes de récupérer le complexe Fe-sidérophore.

**Tableau III.22** : Matrice des coefficients de corrélation de Pearson pour la croissance, l'activité et la production spécifique des sidérophores produits par *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* (en gras, valeurs significatives au seuil  $\alpha=0,05$ ).

<i>P. fluorescens</i> \ <i>P. aeruginosa</i>	Concentration cellulaire	Activité des sidérophores	Production spécifique
Concentration cellulaire		<b>0,778</b>	0,017
Activité des sidérophores	<b>0,277</b>		<b>0,504</b>
Production spécifique	0,090	<b>0,926</b>	

En conclusion, les substrats les plus efficaces pour l'optimisation de la production des sidérophores par *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* sont le fructose, le glycérol et le mannitol à 6,7 g/L. Le lait écrémé a également été retenu lors des expériences suivantes car il peut être co-immobilisé dans des billes d'alginate. Le glucose n'a pas été retenu en raison des conditions trop acides qu'il induit pour la stabilité des sidérophores.

### 3.2. Biais du test CAS en présence de métaux

La méthode de Schwynn et Neilands (1987) est basée sur l'affinité des sidérophores pour le FeIII complexé par le réactif CAS. Cet équilibre peut toutefois être déstabilisé en présence d'autres métaux trivalents (CrIII) ou divalents (PbII, HgII) qui peuvent soit complexer le réactif CAS, soit se lier aux sidérophores libres du milieu. Dans tous les cas, l'activité globale des sidérophores peut être sous estimée (**tableau III.23**).

**Tableau III.23** : Estimation des formes présentes après ajout du réactif CAS-FeIII dans des milieux contenant des métaux et des sidérophores.

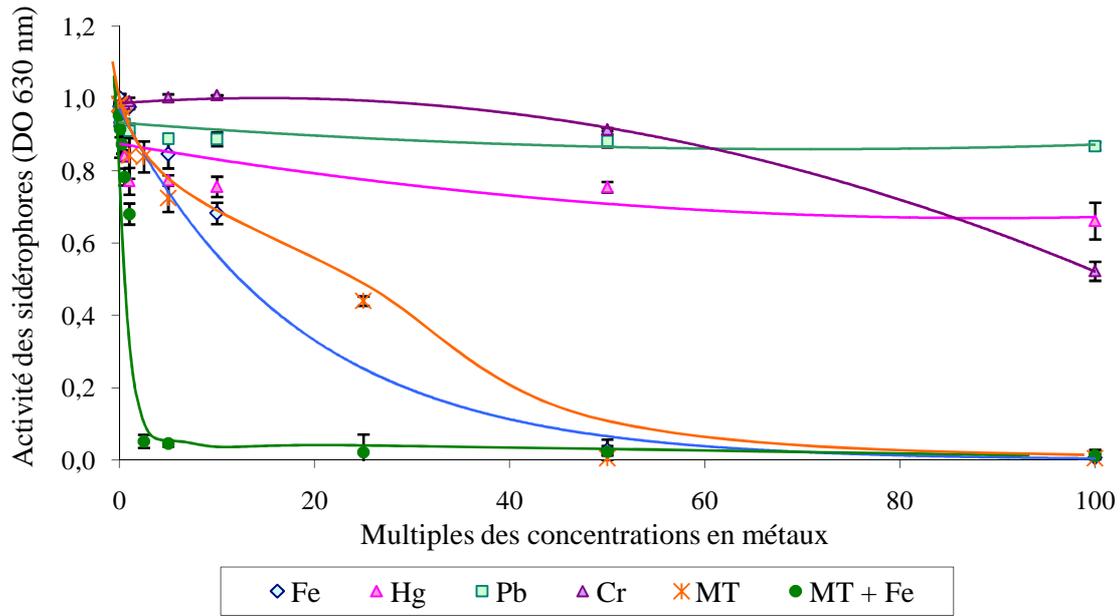
Métaux dans le milieu	Formes potentiellement présentes après ajout de sidérophores (S) au réactif CAS
-	CAS, [S-FeIII]
FeIII*	CAS, [CAS-FeIII], [S-FeIII], [S-FeIII*], [CAS-FeIII*]
MT (CrIII, HgII, PbII)	CAS, [CAS-FeIII], [S-FeIII], [S-MT], [CAS-MT]
FeIII*, MT (CrIII, HgII, PbII)	CAS, [CAS-FeIII], [S-FeIII], [S-FeIII*], [CAS-FeIII*], [S-MT], [CAS-MT]

FeIII\* : correspond au Fe ajouté au milieu, à distinguer du FeIII contenu dans le réactif CAS.

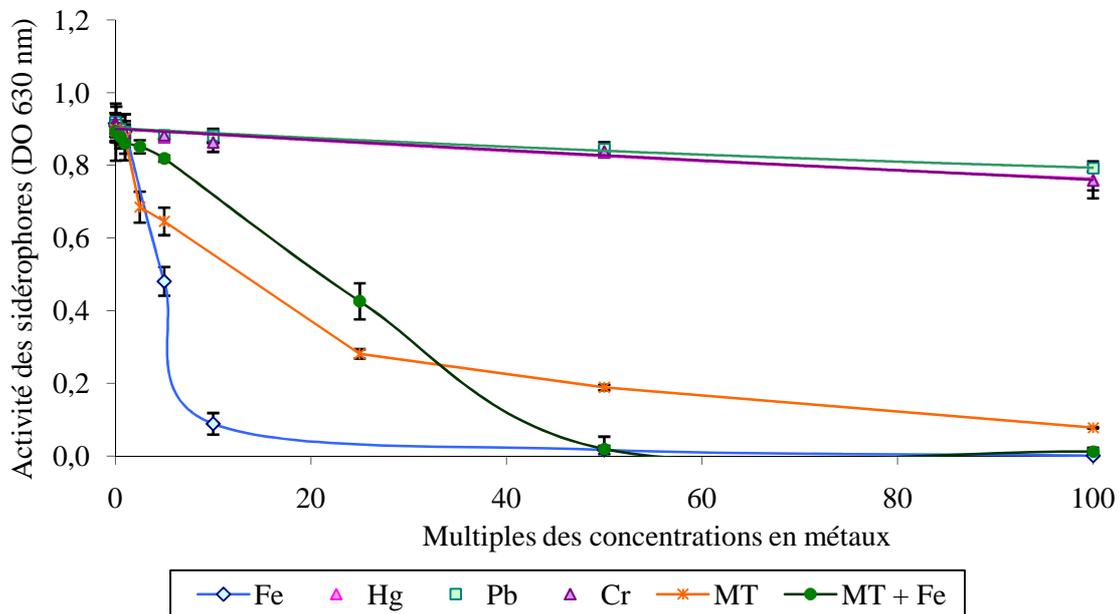
Pour estimer l'activité des sidérophores dans un milieu contenant des métaux, des courbes de calibration ont été réalisées. Les **figures 3.18 et 3.19** montrent l'évolution de la DO du milieu minimum à 630 nm après ajout du réactif CAS, d'une quantité donnée de sidérophores et d'une concentration variable en métaux ajoutés en mélange ou individuellement.

Quel que soit le microorganisme, lorsque la concentration en Fe du milieu de culture augmente, la DO diminue fortement. Cela signifie qu'une partie des sidérophores complexe le FeIII du milieu au lieu de dissocier le FeIII du complexe [CAS-FeIII]. Lorsque la concentration en Fe du milieu de culture dépasse 40 mg/L, 50% des complexes [CAS-FeIII] ne sont plus dissociés. Le Cr, Hg et Pb ajoutés individuellement au milieu de culture modifient moins fortement (surtout pour *P. fluorescens*) la mesure d'activité des sidérophores en raison de leur plus faible affinité pour les sidérophores en comparaison du FeIII. La **figure 3.18** montre cependant qu'environ 50% des complexes [CAS-FeIII] ne sont plus dissociés lorsque la concentration en CrIII atteint 100 fois la concentration de départ soit 500 mg/L, ce qui signifie que les sidérophores du milieu complexent préférentiellement CrIII avant de dissocier le complexe [CAS-FeIII]. Les sidérophores produits par *P. aeruginosa* complexent les métaux dans l'ordre suivant d'affinité : Fe>>Cr>Hg>Pb





**Figure 3.18** : Evolution de l'activité des sidérophores de *P. aeruginosa* en fonction de la concentration en métaux ajoutés en mélange (MT : Cr, Hg et Pb) ou individuellement au milieu de culture minimum, avec ou sans Fe. Les concentrations en métaux sont exprimées en multiples de la concentration suivante : Hg, 0,2 mg/L ; Cr, 5 mg/L ; Pb, 13 mg/L ; Fe, 4 mg/L. Les barres verticales représentent les écart-types.



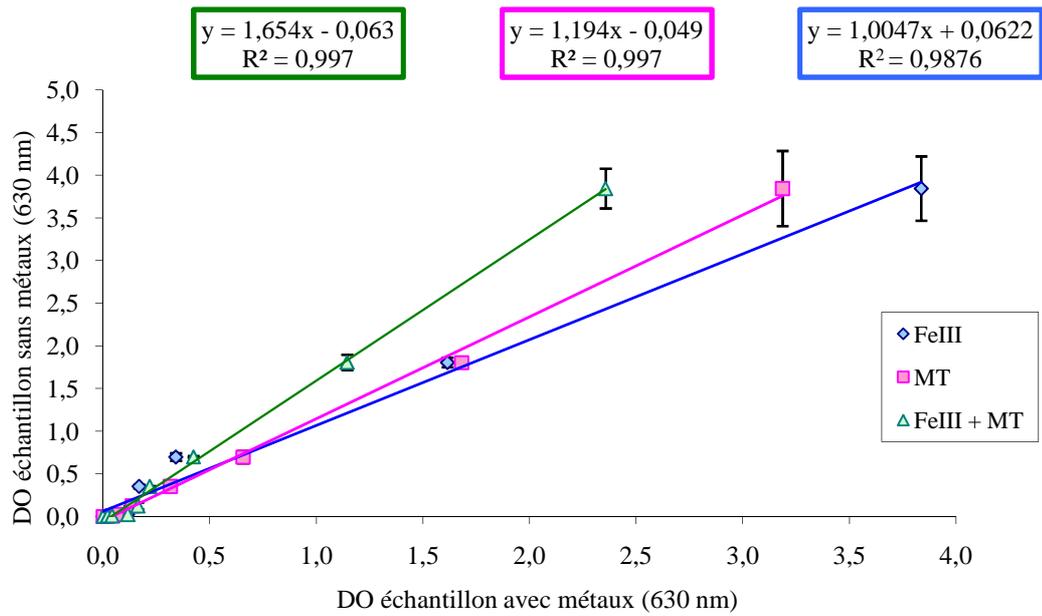
**Figure 3.19** : Evolution de l'activité des sidérophores de *P. fluorescens* en fonction de la concentration en métaux ajoutés en mélange (MT : Cr, Hg et Pb) ou individuellement au milieu de culture MM, avec ou sans Fe. Les concentrations en métaux sont exprimées en multiples de la concentration suivante : Hg, 0,2 mg/L ; Cr, 5 mg/L ; Pb, 13 mg/L ; Fe, 4 mg/L. Les barres verticales représentent les écart-types.

Comme pour *P. aeruginosa*, l'affinité des sidérophores de *P. fluorescens* pour le FeIII est largement supérieure à celle du Cr, Hg et Pb (**figure 3.19**). En revanche l'affinité pour ces trois métaux est très proche. Pratiquement aucun complexe [CAS-FeIII] n'est dissocié lorsque la concentration en Fe dans le milieu atteint 40 mg/L. Un effet plus que cumulatif des métaux en mélange (MT) s'observe également. Cet effet est comparable pour les deux *Pseudomonas*. Par contre l'ajout de Fe au mélange MT amplifie la diminution de la DO avec *P. aeruginosa* tandis qu'il la réduit avec *P. fluorescens*. Les différences de proportion entre la pyoverdine et la pyochéline produites par ces deux espèces de *Pseudomonas* ou la structure des sidérophores produits peuvent expliquer cette différence.

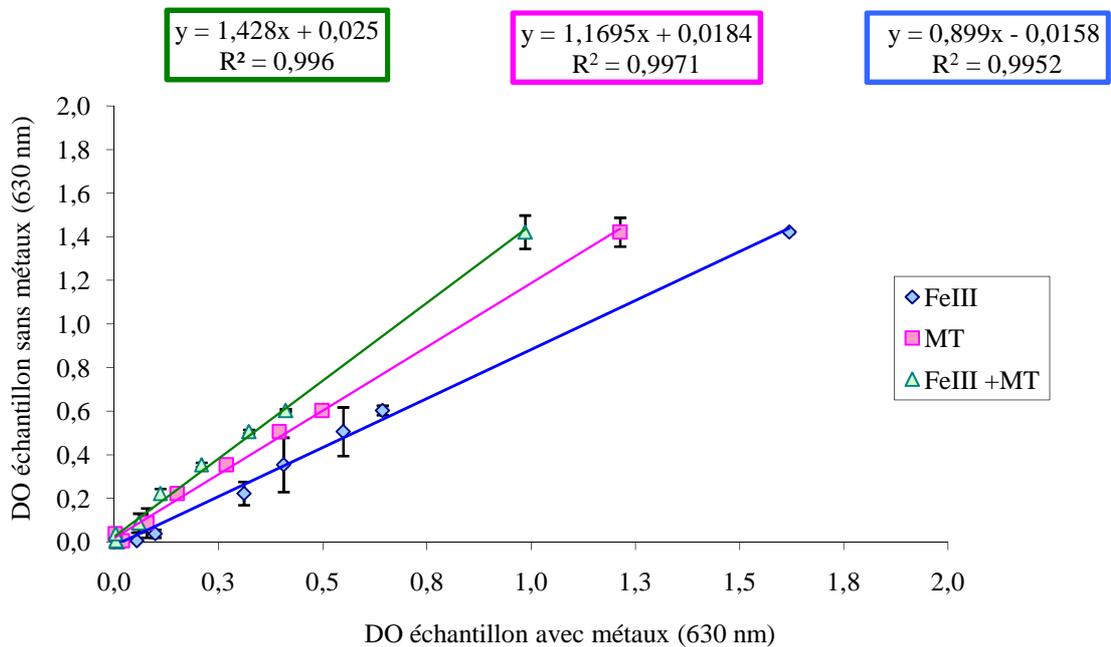
La pyoverdine a une plus forte affinité pour les ions trivalents FeIII et CrIII (Budzikiewicz *et al.* 2002) et la pyochéline pour les ions divalents ZnII, CuII, CoII, NiII (Cuppels *et al.* 1987; Visca *et al.* 1992). Nos résultats laissent à penser que le surnageant du milieu de culture carencé en Fe contient, pour les deux *Pseudomonas*, une majorité de pyoverdine mais également de la pyochéline puisque certains ions divalents tel que HgII peuvent être complexés. En cas de carence en Fe, il a en effet été démontré qu'une plus grande proportion de pyoverdine était produite par rapport à la pyochéline du fait de sa plus grande affinité pour le Fe (Meyer 2000; Poole et McKay 2003).

Pour éliminer ce biais de mesure de l'activité des sidérophores lié à la méthode utilisée, des courbes de calibration ont été réalisées (**figures 3.20 et 3.21**), pour différentes concentrations en sidérophores en présence ou non de métaux (Fe, MT, Fe+MT) aux concentrations choisies pour les expériences. Ces courbes sont utilisées par la suite pour la détermination du niveau d'activité des sidérophores dans les milieux contenant des métaux.





**Figure 3.20 :** Relation entre l'activité des sidérophores de *P. aeruginosa* dans un milieu minimum sans métaux et l'activité des sidérophores dans le même milieu avec métaux : Fe (4 mg/L) et MT (Cr 5 mg/L, Hg 0,2 mg/L, Pb 4 mg/L). Les barres verticales représentent les écart-types.



**Figure 3.21 :** Relation entre l'activité des sidérophores de *P. fluorescens* dans un milieu minimum sans métaux et l'activité des sidérophores dans le même milieu avec métaux : Fe (4 mg/L) et MT (Cr 5 mg/L, Hg 0,2 mg/L, Pb 4 mg/L). Les barres verticales représentent les écart-types.

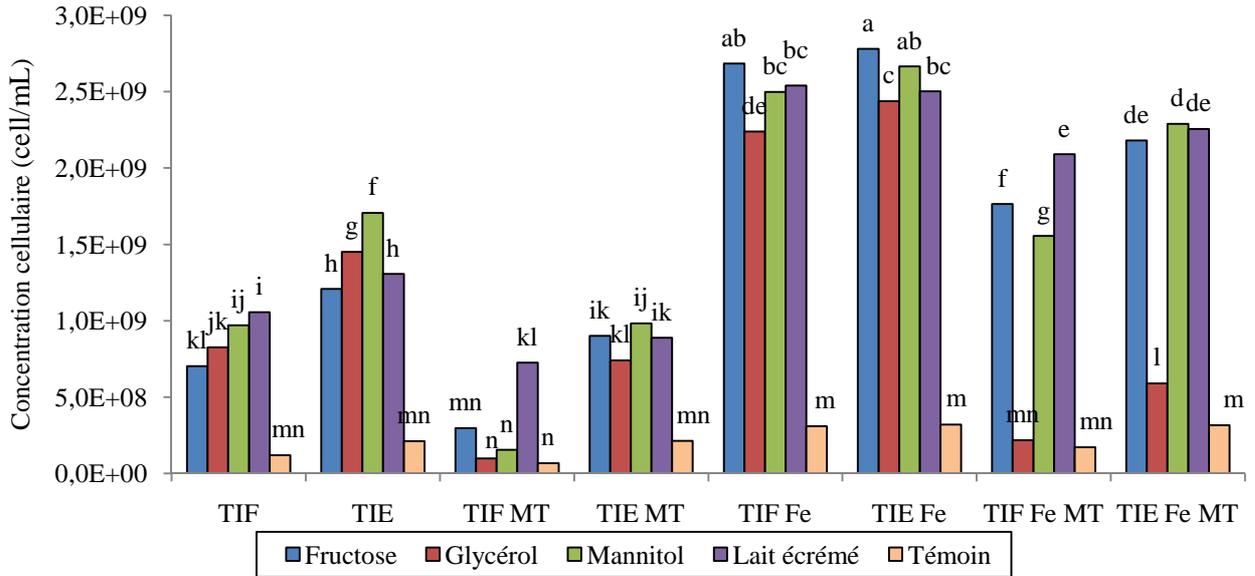
### 3.3. Influence des substrats et des métaux sur la production de sidérophores

Les résultats obtenus pour la croissance de *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* inoculées avec un faible inoculum ( $6,7 \cdot 10^4$  cellules/mL, TIF) ou un fort inoculum ( $6,7 \cdot 10^7$  cellules/mL, TIE) sont présentés sur **les figures 3.22 et 3.23**. Les cultures ont été réalisées dans du milieu minimum avec différents substrats à 6,7 g/L (fructose, glycérol, mannitol, lait écrémé) avec ou sans métaux (MT) (Cr : 5 mg/L ; Hg 0,2 mg/L ; Pb : 13 mg/L) et avec ou sans FeIII (4 mg/L). Ces concentrations correspondent à la fraction bioaccessible des métaux de notre sol d'étude. Un témoin sans substrat a été réalisé pour chaque modalité d'inoculation.

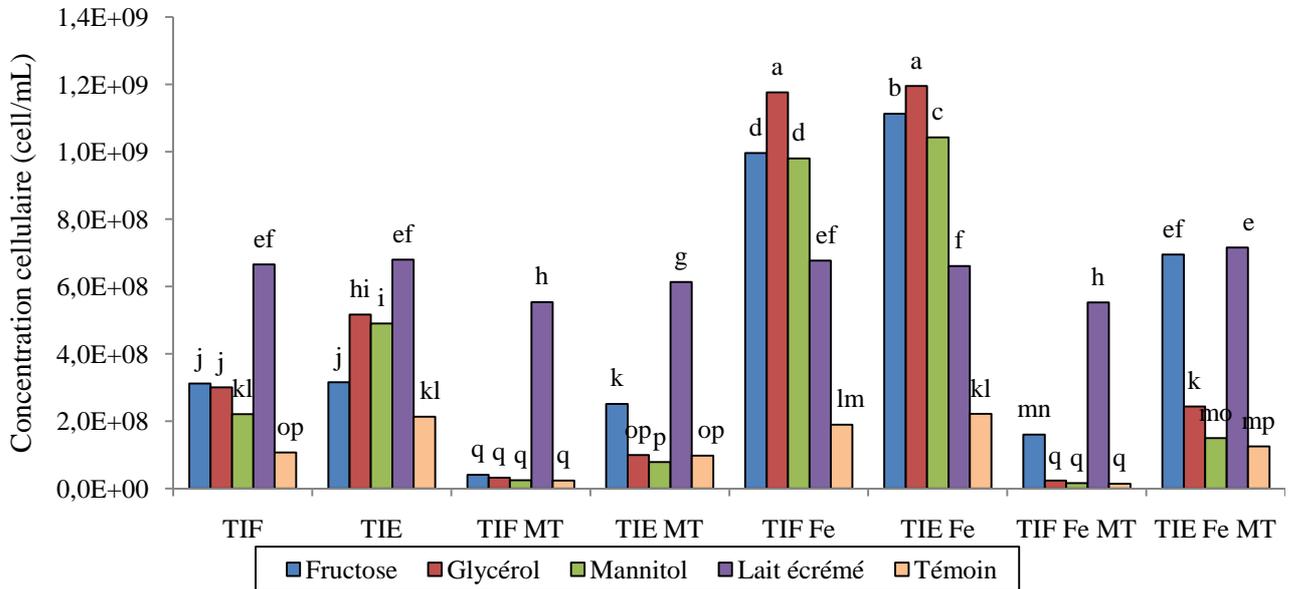
La présence de FeIII stimule la croissance des deux bactéries que soit le substrat ajouté. En revanche, l'ajout de métaux (MT) entraîne un effet toxique et diminue de façon significative la concentration cellulaire des deux bactéries, quelle que soit la taille de l'inoculum, jusqu'à 6 fois pour *P. fluorescens* (inoculum TIE) en présence de mannitol, par rapport au milieu sans MT. La concentration cellulaire de *P. aeruginosa* est également réduite en présence de MT mais moins fortement : jusqu'à 1,9 fois pour le glycérol avec TIE. *P. aeruginosa* est moins sensible que *P. fluorescens* aux métaux probablement en raison de sa capacité à produire des biosurfactants qui peuvent agir comme une barrière contre les ions métalliques, en les complexant. Des biosurfactants ont en effet été détectés dans les milieux contenant du glycérol ou du mannitol à 6,7 g/L inoculés avec *P. aeruginosa* (données non présentées).

Dans les milieux avec Fe et MT, la croissance de *P. aeruginosa* et de *P. fluorescens* est fortement réduite par rapport au milieu contenant seulement du Fe. La concentration cellulaire de *P. aeruginosa* et de *P. fluorescens* pour le faible inoculum avec glycérol est, respectivement, 10 et 51 fois plus faible en présence de MT et Fe par rapport au milieu avec Fe seul. Cette réduction de la croissance pourrait traduire une perturbation dans l'assimilation du Fe par les bactéries ou d'autres fonctions cellulaires dépendantes de la concentration en Fe, due aux interactions avec les métaux toxiques, comme cela a été démontré pour le GaIII qui perturbe le métabolisme du Fe chez *P. aeruginosa* (Kaneko *et al.* 2007). Les concentrations cellulaires sont néanmoins plus élevées avec le milieu Fe+MT comparativement au milieu MT.

Lorsque le Fe est limitant dans le milieu, les besoins de *P. fluorescens* en azote sont supérieurs à ceux en carbone (Persson *et al.* 1990), ce qui peut expliquer qu'il n'y ait pas de différences significatives entre substrats carbonés (fructose, glycérol, mannitol) dans le milieu sans Fe. En revanche, le lait écrémé, qui apporte du carbone et de l'azote, augmente la croissance dans les milieux sans Fe par rapport au témoin.



**Figure 3.22** : Croissance cellulaire moyenne de *P. aeruginosa* en fonction des différents substrats à 6,7g/L, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).



**Figure 3.23** : Croissance cellulaire moyenne de *P. fluorescens* en fonction des différents substrats à 6,7 g/L, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).

En ce qui concerne l'effet des substrats, globalement leur présence stimule la croissance de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*, excepté pour le glycérol et le mannitol avec le faible inoculum TIF en présence de métaux mais également pour le fort inoculum TIE en présence de métaux pour *P. fluorescens*. La concentration cellulaire de *P. fluorescens* dans le milieu avec le lait écrémé varie assez peu quelle que soit la taille de l'inoculum et la nature du milieu avec une concentration cellulaire comprise entre  $5,5 \cdot 10^8$  et  $7,2 \cdot 10^8$  cellules/mL. Pour *P. aeruginosa* le même effet est observé bien que la concentration cellulaire soit supérieure à celle de *P. fluorescens*, quelle que soit la modalité. Les substrats les plus efficaces en présence de Fe et de métaux aux teneurs où ils sont potentiellement bioaccessibles dans le sol de l'étude, sont le mannitol, le fructose et le lait écrémé, ce dernier étant le plus efficace quels que soient le milieu ou la taille de l'inoculum.

L'ajout de Fe réduit fortement l'activité des sidérophores pour les deux *Pseudomonas*, indépendamment de la taille de l'inoculum (**figures 3.24 et 3.25**). Le FeIII réprime en effet la synthèse de pyoverdine et de pyochéline lorsque sa concentration atteint  $10 \mu\text{M}$ , soit  $0,56 \text{ mg/L}$  ; la concentration en Fe utilisée pour cette étude est de  $4 \text{ mg/L}$  (Díaz de Villegas *et al.* 2002; Visca *et al.* 1992).

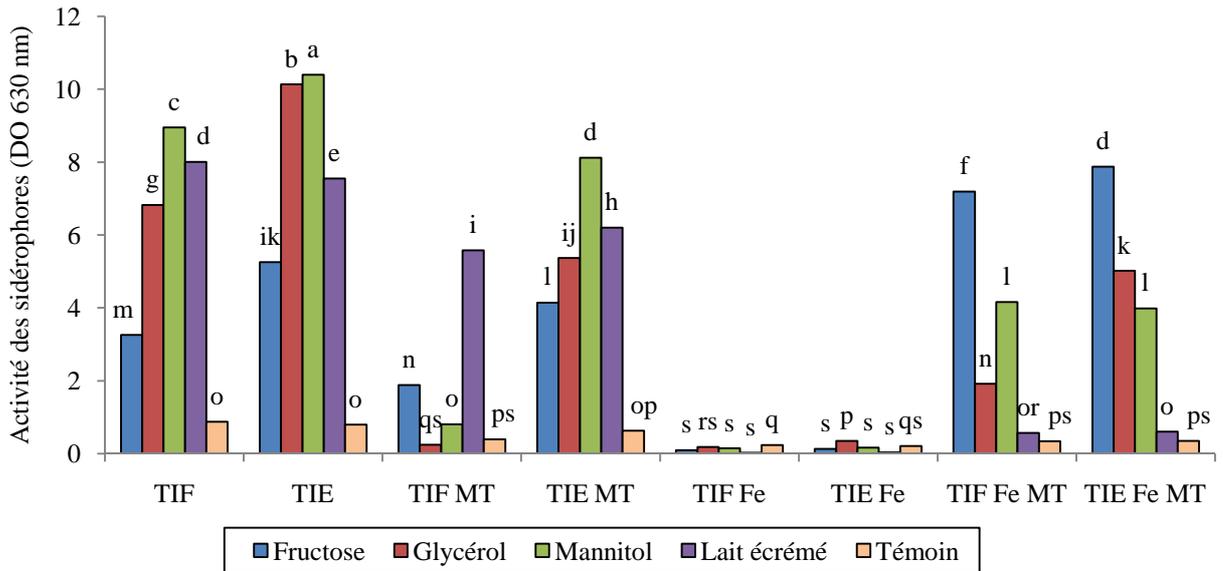
Excepté le milieu avec Fe, la taille de l'inoculum influence positivement la production de sidérophores par *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*.

L'efficacité des substrats pour la production de sidérophores, quel que soit le milieu (avec ou sans MT et/ou Fe), suit l'ordre suivant :

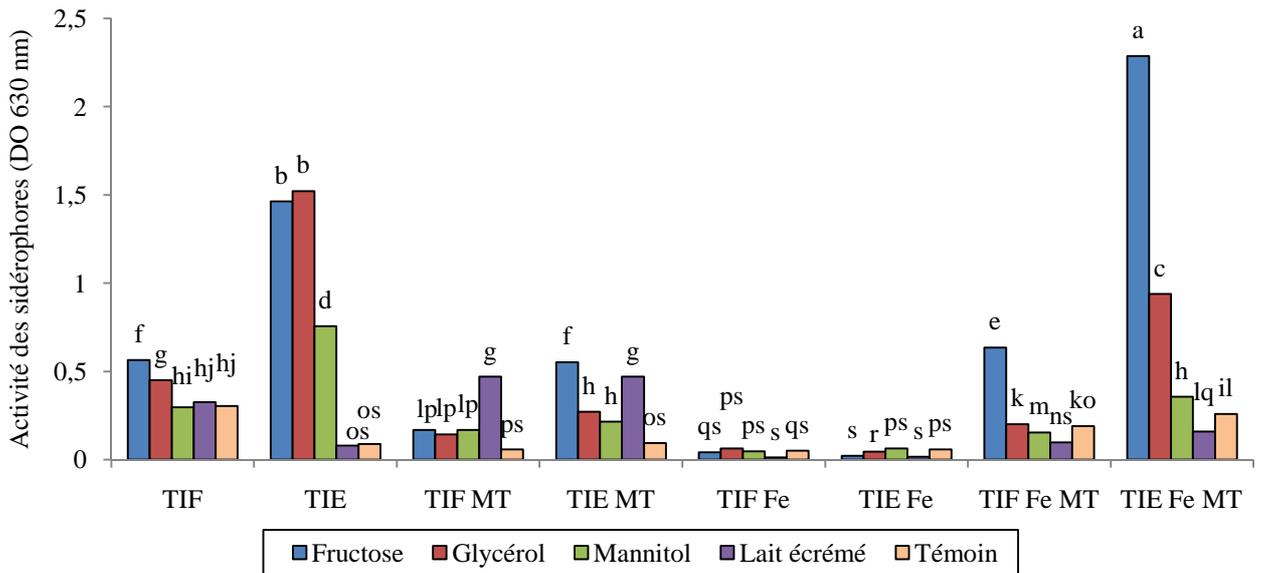
- Pour *P. aeruginosa* : mannitol > fructose, glycérol > lait écrémé ;
- Pour *P. fluorescens* : fructose > glycérol > mannitol > lait écrémé.

Le fructose est le substrat le plus efficace pour la production de sidérophores par les deux *Pseudomonas* dans le milieu avec Fe et MT, c'est à dire proche du sol d'étude.

La présence de MT, excepté avec le lait écrémé pour *P. fluorescens*, réduit significativement l'activité des sidérophores des deux *Pseudomonas* par rapport au milieu sans MT. Ces résultats sont confirmés par une étude de Hassen *et al.* (1998), qui montre que le CrIII ( $26 \text{ mg/L}$ ) inhibe la production de pyoverdines de même que le HgII ( $4 \text{ mg/L}$ ). Néanmoins, certains métaux, notamment CuII, ZnII ( $33 \text{ mg/L}$ ), peuvent stimuler la synthèse de pyoverdine (Duffy et Défago 1997; Höfte *et al.* 1993; Teitzel *et al.* 2006).



**Figure 3.24 :** Activité moyenne des sidérophores produits par *P. aeruginosa* en fonction des différents substrats à 6,7 g/L, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).



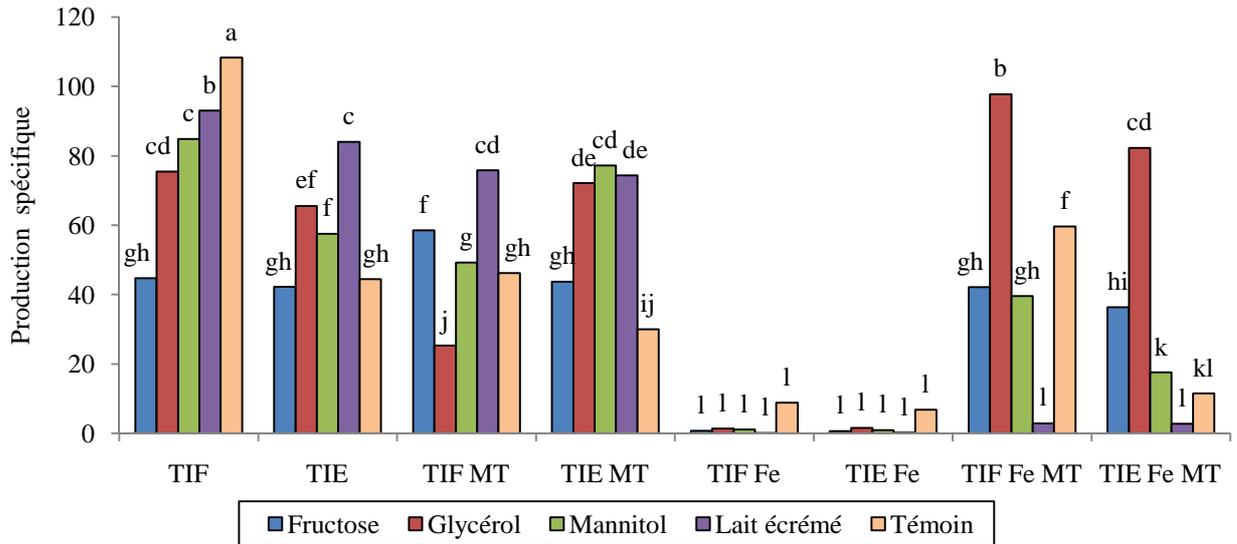
**Figure 3.25 :** Activité moyenne des sidérophores produits par *P. fluorescens* en fonction des différents substrats à 6,7 g/L, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb)



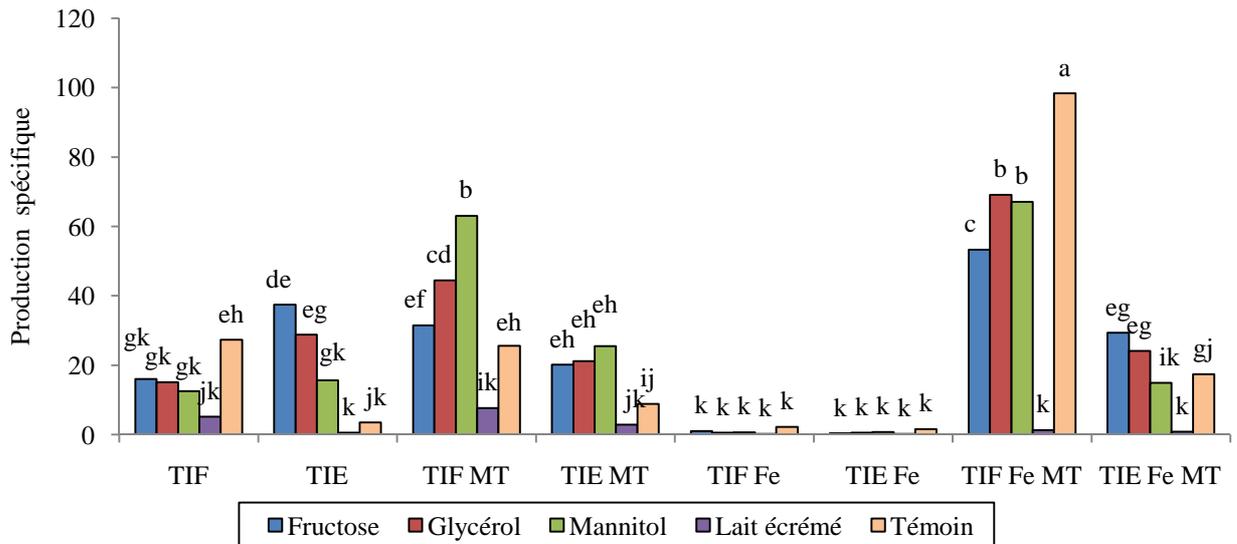
Pour les deux bactéries, quelque soit la taille de l'inoculum, la présence de Fe seul inhibe la production de sidérophores de *P. aeruginosa* ou *P. fluorescens* alors que le mélange Fe et MT l'augmente par rapport au milieu avec Fe seul. Une des hypothèses est que les cations divalents peuvent interagir avec les groupements thiols de la protéine Fur et perturber le mécanisme de répression de la synthèse des sidérophores (Coy et Neilands 1991). En effet, il a été montré *in vitro* que le site de fixation de FeII sur la protéine Fur peut être occupé par CoII, MnII ou d'autres cations divalents (Hantke 2001). La présence de cations divalents tel que PbII et HgII pourrait donc empêcher partiellement la répression de la synthèse des sidérophores en présence de Fe et expliquerait cette augmentation de l'activité des sidérophores dans le milieu MT + Fe par rapport au milieu avec Fe seul.

La production spécifique de sidérophores par *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* est réduite en présence de Fe mais est stimulée en présence de métaux pour *P. fluorescens* (modalité TIF) (**figures 3.26 et 3.27**). Le substrat qui augmente le plus efficacement la production spécifique des deux bactéries, en moyenne, est le glycérol quelle que soit la composition en métaux (MT, Fe, Fe+MT) du milieu de culture.

En présence de Fe et de métaux, la production spécifique de *P. fluorescens* est significativement plus élevée avec le faible inoculum TIF par rapport à TIE. Or la concentration cellulaire de *P. fluorescens* pour ce milieu en fin d'incubation est inférieure à celle des milieux inoculés avec TIE. Par conséquent, chaque cellule bactérienne est exposée à une quantité plus importante de métaux. Cette augmentation de la production de sidérophores pourrait ainsi correspondre à une adaptation des microorganismes en réponse au stress induit par la présence de composés toxiques, les sidérophores pouvant agir comme molécules de défense contre ces métaux (Höfte *et al.* 1993). Ces auteurs suggèrent que la production de sidérophores est liée à une réponse générale au stress déclenchée par une exposition aux métaux (Cd, Ni, Zn) ou à des antibiotiques. Dao *et al.* (1999) ont néanmoins montré que le mercure n'induisait pas de réponse contrairement au Cd. A ce jour, l'induction de la synthèse des sidérophores en réponse au stress métallique n'a pas été clairement établie, du fait de la complexité du système de régulation. Höfte *et al.* (1994) ont néanmoins découvert une enzyme induite en cas de stress, synthétisée par le gène *sss*, également impliqué dans la régulation de synthèse de la pyoverdine.



**Figure 3.26** : Production spécifique moyenne de *P. aeruginosa* en fonction des différents substrats à 6,7 g/L, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).



**Figure 3.27** : Production spécifique moyenne de *P. fluorescens* en fonction des différents substrats à 6,7 g/L indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).

### 3.4. Influence de la co-immobilisation de cellules bactériennes et de substrats sur la production de sidérophores, en présence de métaux

Nous venons de montrer que l'ajout de substrat permet d'augmenter la croissance des microorganismes cultivés en milieu liquide stérile et, dans certains cas, la production de sidérophores. Afin d'optimiser à la fois les chances de survie des microorganismes inoculés dans le sol et la production de sidérophores, une méthode d'immobilisation a d'abord été testée *in vitro*. Les microorganismes ont été piégés dans des billes d'alginate de calcium, pour leur permettre de s'adapter progressivement aux conditions du milieu (Cassidy *et al.* 1996; Gentry *et al.* 2004; McLoughlin 1994).

L'ajout d'amendements dans les supports d'immobilisation permet dans la plupart des cas d'améliorer la survie des microorganismes inoculés. L'incorporation de substrats à des billes d'alginate de calcium, choisies comme support d'immobilisation, a été testée : le glucose, en tant que sucre simple et pour sa simplicité de dosage, et le lait écrémé en tant que substrat plus complexe et parce qu'il a été montré qu'il pouvait favoriser spécifiquement les microorganismes inoculés (Bashan 1998; van Elsas *et al.* 1992).

#### 3.4.1. Etude de l'immobilisation de substrats

Lors de la formation des billes dans du  $\text{CaCl}_2$  à 30 g/L avec 100 g/L de glucose, 62% du glucose est relargué des billes au bout de 90 min, temps nécessaire à la polymérisation des billes d'alginate de calcium. Le lavage des billes dans l'eau a éliminé 11% supplémentaires du glucose présent initialement. Au total, les billes ont perdu environ 75% du glucose mélangé au départ à l'alginate de sodium. Ces résultats sont confirmés par l'étude de Tanaka *et al.* (1984) qui après avoir testé l'incorporation de glucose à raison de 5 à 300 g/L dans des billes d'alginate à 20 g/L, ont montré que tout le glucose était éliminé des billes au bout de 30 minutes. Il a en effet été montré que les substrats de petite taille tels que le glucose, le lactose, le sucrose et le fructose, peuvent diffuser à travers des membranes d'alginate de Ca pratiquement aussi facilement que dans l'eau (Dembczynski et Jankowski 2000; Grunwald *et al.* 1997).

Certains substrats de poids moléculaire élevé sont par contre retenus dans les billes, tel que l'amidon ou le lait-écrémé (Tal *et al.* 1999; van Elsas *et al.* 1992). L'amidon n'ayant pas permis de stimuler significativement la production de sidérophores par les *Pseudomonas* étudiées, c'est le lait écrémé qui a été choisi pour cette étude. Le lait écrémé présente l'avantage de ne pas diffuser hors des billes lors de leur formation et peut polymériser avec l'alginate. Les métabolites produits par les microorganismes immobilisés tel que la pyoverdine ou la pyochéline

(<1500 Da) peuvent par contre diffuser à travers les pores des billes d'alginate qui laissent passer des molécules jusqu'à 20000 Da (Tanaka *et al.* 1984).

### 3.4.2. Etude de l'adsorption des métaux sur les billes d'alginate de calcium.

Une cinétique d'adsorption a été réalisée pour évaluer les capacités d'adsorption des billes inoculées ou non avec *P. fluorescens* dans un milieu contenant un mélange de CrIII (5 mg/L), HgII (0,2 mg/L) PbII (13 mg/L) et/ou du FeIII (4 mg/L). Les résultats sont présentés dans le **tableau III.24**.

**Tableau III.24** : Capacité d'adsorption de métaux (Cr, Fe, Hg, Pb) sur des billes d'alginate de calcium. BS : billes non inoculées ; CI TF billes inoculées avec  $1.10^6$  cellules/mL d'alginate ; CI TE : billes inoculées avec  $1.10^9$  cellules/mL d'alginate ;  $q_e$  : capacité de fixation à l'équilibre.

Temps à l'équilibre (min)	Pb	Cr	Hg	Fe	Pb + Fe	Cr + Fe	Hg + Fe
BS	30	360	>500	90	60	120	>500
CI TF	60	235	235	30	60	120	>500
CI TE	30	360	180	30	60	120	>500
% Adsorption max	Pb	Cr	Hg	Fe	Pb + Fe	Cr + Fe	Hg + Fe
BS	99,61	98,39	57,39*	97,34	99,90	99,13	17,29*
CI TF	99,47	87,86	44,72	93,13	99,92	98,77	24,98*
CI TE	99,49	85,08	71,84	94,12	99,92	98,52	24,98*
$q_e$ (mg métal/g de bille)	Pb	Cr	Hg	Fe	Pb + Fe	Cr + Fe	Hg + Fe
BS	0,153	0,065	0,001*	0,047	0,165	0,075	3,90E-04*
CI TF	0,191	0,066	0,001	0,044	0,173	0,074	5,70E-04*
CI TE	0,154	0,057	0,002	0,049	0,165	0,070	5,70E-04*

\*temps d'équilibre non atteint

L'ordre d'affinité d'adsorption des métaux, pris individuellement, sur les billes d'alginate non inoculées (BS) est le suivant : PbII>FeIII>CrIII>HgII. Le Pb et le Fe sont les métaux qui s'adsorbent le plus rapidement sur les billes alors que l'adsorption du mercure est beaucoup plus lente. La faible concentration en Hg utilisée dans cette expérience peut expliquer le fait que

l'équilibre ne soit pas atteint au bout de 500 min tandis que d'autres études (Arica *et al.* 2004; Kacar *et al.* 2002) ont montré qu'avec 200 mg/L de Hg, l'équilibre était atteint au bout de 60 min. Il a en effet été prouvé que plus la concentration initiale en métaux dans le milieu était élevée, plus le temps d'équilibre était rapidement atteint (Lin et Lin 2005; Volesky et Holan 1995).

En présence de Fe, le mercure est beaucoup moins adsorbé, ce qui reflète une compétition entre les deux métaux pour les sites d'adsorption.

L'immobilisation des cellules bactériennes pour le faible inoculum modifie la quantité de Pb adsorbé (CITF). En présence de Fe, aucune différence significative liée à la présence de bactéries n'est observée.

Nous avons en parallèle testé le rôle des microorganismes sur l'adsorption des métaux : des cellules de *P. fluorescens* en suspension ( $6,7 \cdot 10^7$  cellules/mL) n'ont montré aucune capacité d'adsorption, probablement du fait que la quantité de biomasse était trop faible en comparaison des métaux disponibles (données non présentées).

La présence de billes d'alginate dans le milieu réduit globalement de plus de 90% le Cr, Pb et Fe ainsi que de plus de 40% la concentration en Hg dans le milieu sans Fe, limitant ainsi la toxicité des métaux à la fois pour les cellules piégées dans les billes et les cellules relarguées dans le milieu. La capacité de l'alginate à adsorber les métaux a déjà été démontrée pour le Cd, Co, Cu, Hg, Mn et Zn (Arica *et al.* 2004; Gotoh *et al.* 2004; Lebeau *et al.* 2002; Ozdemir *et al.* 2005). Dans les billes d'alginate de Ca, la majorité des métaux est adsorbé à la surface des billes et seule une faible quantité de métal parvient à diffuser vers le centre de la bille (Xiangliang *et al.* 2005). Pandley *et al.* (2002) ont quant à eux observé que seulement 8% du Cr et 9% du Fe, initialement présent à 2,8 mg/L et 22 mg/L respectivement, pouvaient pénétrer dans les billes d'alginate.

### 3.4.3. Influence de la co-immobilisation de cellules bactériennes et de substrats sur la production de sidérophores

Le test réalisé ici cherche à évaluer la capacité des cellules sous forme libre (CL) ou immobilisées (CI) dans des billes d'alginate de calcium à produire des sidérophores avec ou sans lait écrémé dans le milieu, et en présence ou non d'un mélange de métaux (Cr, Hg, Pb) (MT) avec ou sans Fe.

Lorsque les pores des billes sont saturés au cours de la croissance, les cellules bactériennes sont relarguées dans le milieu de culture. Le relargage intervient en moyenne au bout de 48 heures pour les deux *Pseudomonas*, c'est à dire lorsque la concentration cellulaire

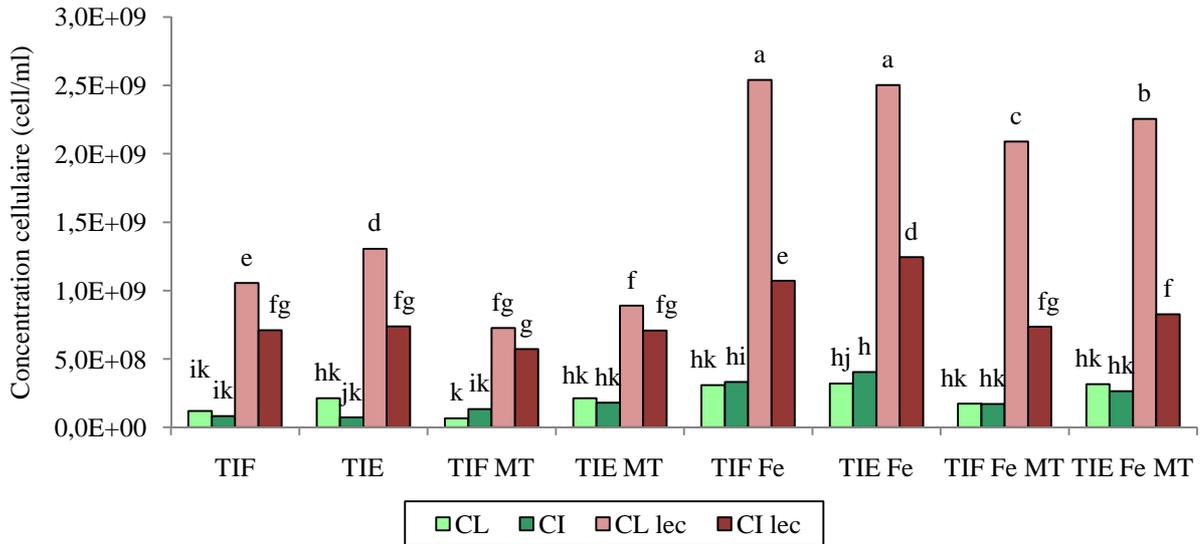
dans les billes est maximale (données non présentées). La concentration cellulaire mesurée dans le milieu de culture pour la modalité CI correspond à la fois aux cellules relarguées et à leur croissance en tant que cellules libres dans le milieu de culture.

La croissance de *P. aeruginosa* pour les cellules libres et immobilisées est maximale avec le lait écrémé (**figure 3.28**). Pour *P. fluorescens*, le même effet est observé sauf pour la modalité TIE sans métaux et le milieu contenant du Fe seul, pour lesquels la concentration cellulaire des cellules immobilisées avec lait écrémé n'est pas significativement différente de celle des cellules libres sans substrat (**figure 3.29**).

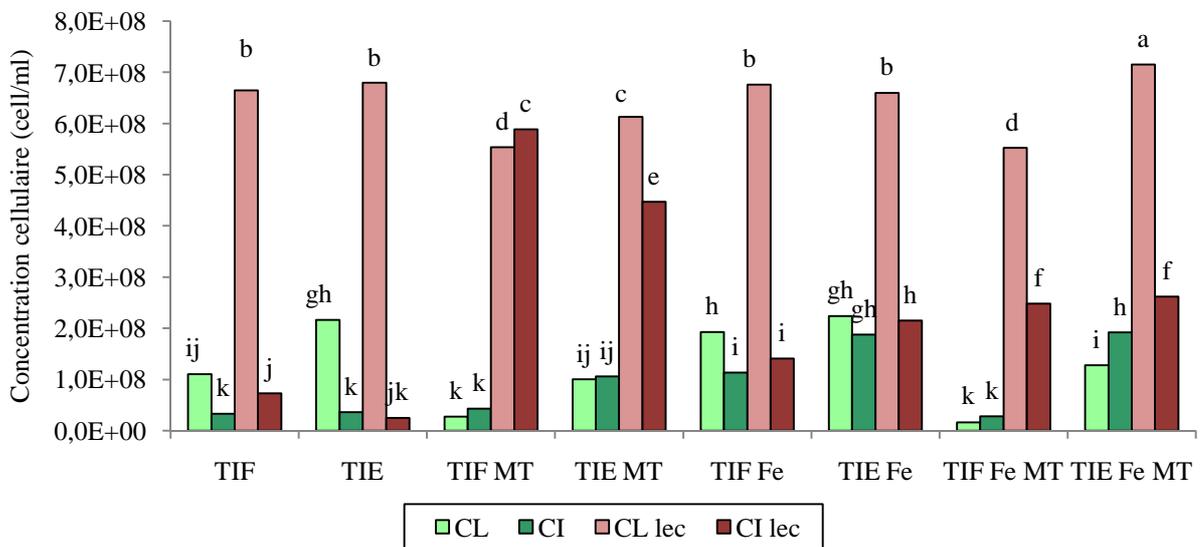
En présence de lait écrémé, la concentration bactérienne pour la modalité cellules immobilisées est inférieure à celle des cellules libres, quelle que soit la teneur en métaux dans le milieu, excepté pour la modalité TIF MT pour *P. fluorescens*. Plusieurs explications peuvent être envisagées, d'une part que l'immobilisation du lait écrémé crée un encombrement stérique dans les billes, limitant le développement des cellules bactériennes et les empêchant donc d'être relarguées dans le milieu ; d'autre part qu'en raison de la polymérisation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du lait écrémé avec l'alginate, le substrat est sans doute moins disponible pour les bactéries immobilisées que lorsqu'elles sont sous forme libres. Cependant le substrat est quand même partiellement disponible car la concentration des cellules immobilisées de *P. aeruginosa* avec lait-écrémé est supérieure à celle des cellules libres sans lait écrémé, de même que pour *P. fluorescens* dans les milieux avec MT. L'ajout de lait écrémé dans les billes d'alginate de calcium modifie aussi la structure des billes en un réseau complexe, pouvant piéger plus efficacement les cellules bactériennes, alors que sans lait écrémé, l'alginate de Ca est organisé en couches concentriques pouvant favoriser le relargage des cellules (Bashan 1986).

L'avantage de l'immobilisation de *P. aeruginosa* est qu'en présence ou en absence de métaux, la croissance cellulaire varie assez peu d'une modalité à l'autre. L'adsorption de 90% du Cr et du Pb et de 40% du Hg sur les billes d'alginate a pu permettre de limiter la toxicité des métaux vis-à-vis des cellules bactériennes (voir paragraphe 3.4.2).

La diminution de croissance observée pour les cellules de *P. fluorescens* immobilisées avec du lait écrémé entre le milieu contenant des MT et le milieu Fe+MT peut être due au fait que Hg est moins adsorbé sur les billes en présence de Fe (40% sans Fe contre 20% dans un milieu contenant du Fe). De ce fait, les cellules peuvent être exposées à une quantité plus importante de Hg dans le milieu avec Fe que dans le milieu sans Fe.



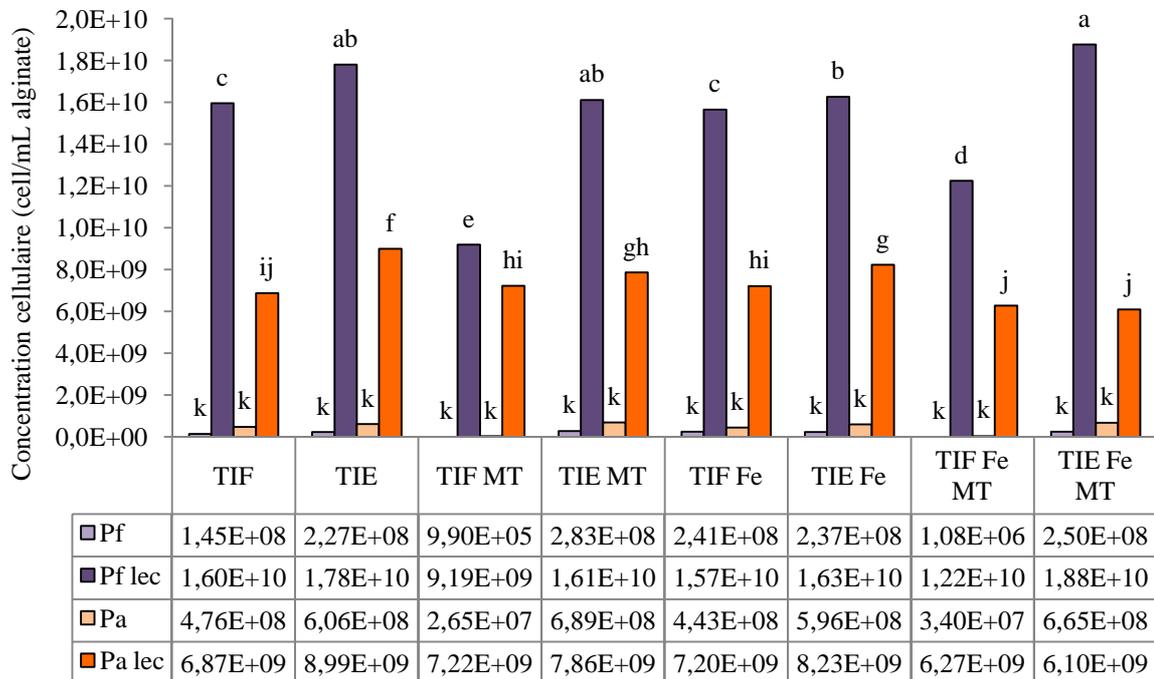
**Figure 3.28** : Croissance cellulaire moyenne de *P. aeruginosa* en fonction des différentes modalités d'inoculation : CL : cellules libres, CI : cellules immobilisées, lec : lait écrémé, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).



**Figure 3.29** : Croissance cellulaire moyenne de *P. fluorescens* en fonction des différentes modalités d'inoculation : CL : cellules libres, CI : cellules immobilisées, lec : lait écrémé, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).

La taille de l'inoculum n'a pas d'effet significatif sur la croissance des cellules immobilisées de *P. aeruginosa* excepté pour le milieu avec Fe et a un effet positif sur les cellules de *P. fluorescens* CI lec uniquement en présence de Fe.

La concentration cellulaire de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* pour la modalité TIE dans les billes sans substrat n'est pas différente en présence ou non de MT et/ou de Fe (**figure 3.30**). En revanche pour la modalité TIF, la concentration cellulaire de *P. aeruginosa* et de *P. fluorescens* est diminuée de façon drastique (jusqu'à 223 fois pour *P. fluorescens*) en présence de MT qu'il y ait ou non du Fe. L'effet toxique des métaux est donc annulé lorsque la taille de l'inoculum est suffisante, probablement parce que la diffusion des métaux dans les billes est limitée par la présence d'une forte densité bactérienne qui peut créer une barrière supplémentaire à la circulation des métaux dans la matrice d'alginate (Vilchez *et al.* 1997). Par ailleurs, la concentration cellulaire de *P. fluorescens* dans les billes est supérieure à celle de *P. aeruginosa*, avec le lait écrémé, ce qui pourrait expliquer le plus faible relargage des cellules de *P. fluorescens* observée sur la figure 3.29 par rapport à *P. aeruginosa*. Les concentrations cellulaires au sein des billes avec le lait écrémé varient assez peu par rapport à celles mesurées dans le milieu extérieur. Elles sont comprises entre  $6.10^9$  et  $9.10^9$  cellules/mL pour *P. aeruginosa* et  $9.10^9$  et  $19.10^9$  cellules/mL pour *P. fluorescens*.



**Figure 30** : Croissance cellulaire moyenne de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* dans les billes d'alginate en fonction des différentes modalités d'inoculation : CL : cellules libres, CI : cellules immobilisées, lec : lait écrémé, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).

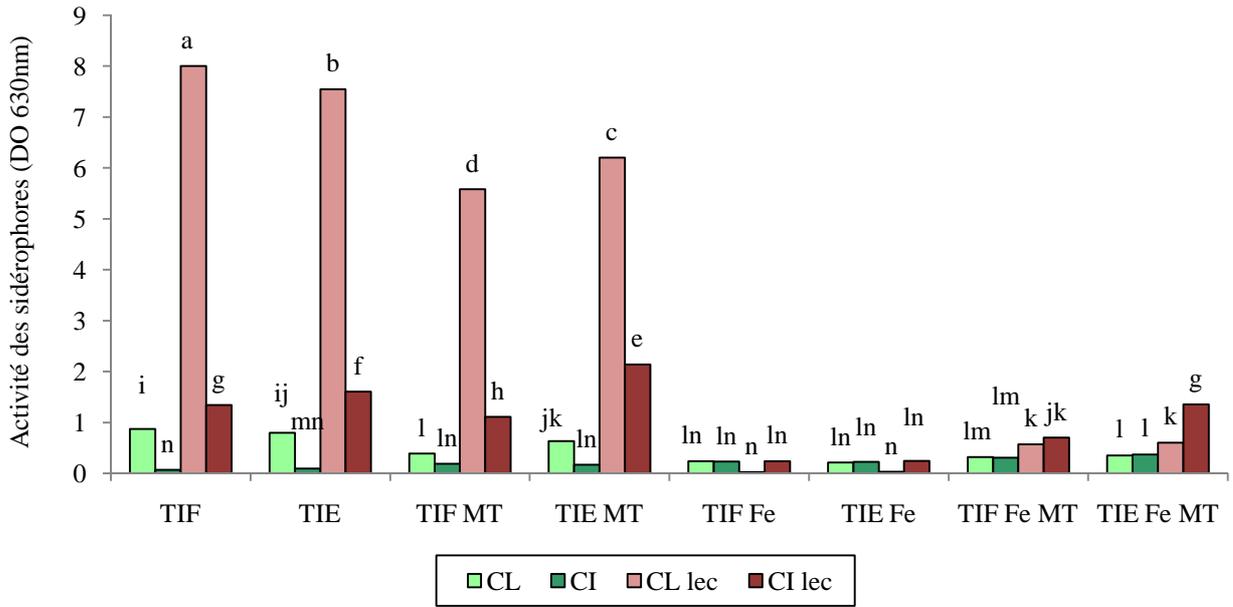


En absence de Fe, l'activité des sidérophores est stimulée par le lait écrémé en particulier avec les cellules libres (**figures 3.31 et 3.32**). L'immobilisation des cellules tend à diminuer la quantité de sidérophores produits excepté pour *P. fluorescens* sans lait écrémé avec TIE MT, et *P. aeruginosa* avec du lait écrémé TIE MT. La diminution de production peut provenir de la moindre accessibilité des substrats pour les cellules immobilisées.

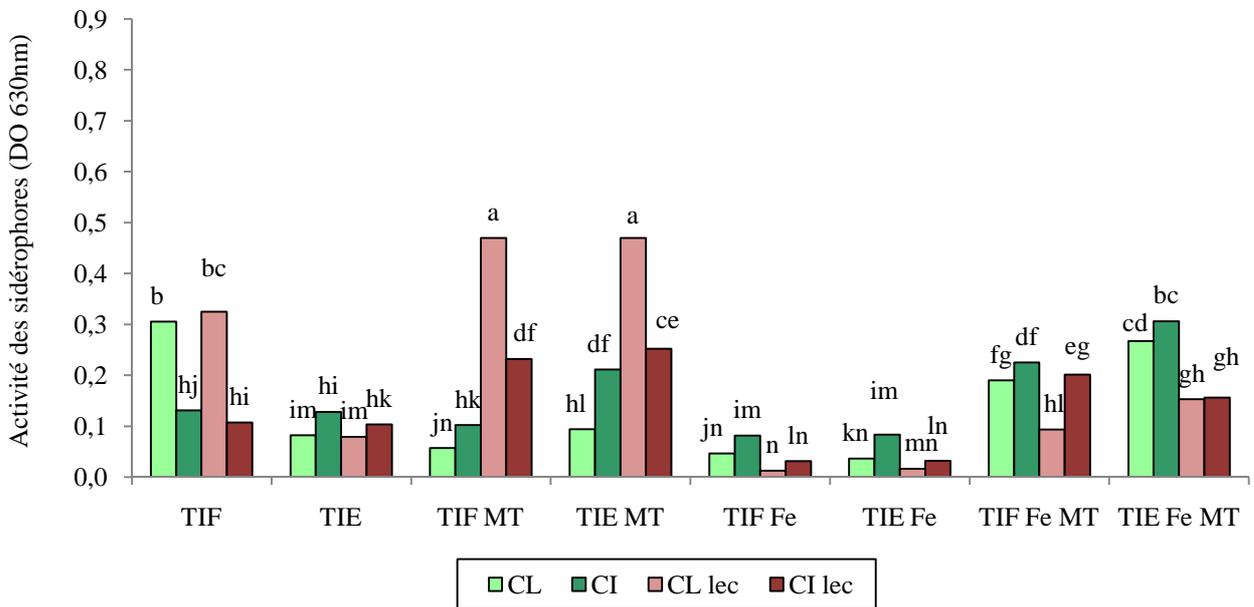
L'augmentation de l'activité des sidérophores en présence de métaux, est observée pour les cellules immobilisées de *P. fluorescens* (MT et Fe+MT) et pour *P. aeruginosa* (Fe+MT). Les métaux étant majoritairement adsorbés à la surface des billes, la faible quantité de métaux à disposition des bactéries pourrait jouer le rôle de facteur de stress, sans être toxiques, en stimulant la production de sidérophores par ces cellules.

En présence de Fe, l'activité des sidérophores diminue de façon significative quel que soit le type d'inoculation, excepté pour le témoin CI. D'une manière générale, dans un milieu sans Fe l'activité des sidérophores est supérieure avec les CL par rapport aux CI alors que les CI donnent les meilleurs résultats dans les milieux avec Fe par rapport aux CL, excepté pour *P. fluorescens* pour les cellules sans lait écrémé. Cela confirme que l'adsorption du Fe sur les billes crée un déficit en Fe à la fois pour les cellules relarguées dans le milieu extérieur aux billes mais également pour les cellules restant dans les billes. Nous avons observé précédemment que 97% des 4 mg de Fe/L de milieu de culture sont adsorbés sur les billes, le Fe restant ne devrait donc pas, en théorie, inhiber la synthèse de pyoverdine et de pyochéline, qui n'est réprimée qu'à partir de 0,56 mg/L de FeIII (Visca *et al.* 1992). Pourtant, l'activité des sidérophores produits par les cellules immobilisées diminue en présence de Fe, comparativement aux CI dans les milieux sans Fe, ce qui laisserait à penser que le FeIII ne s'adsorbe pas en totalité à la surface des billes mais peut aussi diffuser.

Pour la modalité TIE avec lait écrémé dans le milieu Fe + MT, l'activité des sidérophores de *P. aeruginosa* diminue 10 fois par rapport au témoin pour les CL et seulement de 1,5 fois pour les CI par rapport au témoin (sans Fe ni MT). La co-immobilisation des cellules bactériennes et du substrat permettrait donc d'atténuer les effets des conditions du milieu sur la production de sidérophores.



**Figure 3.31** : Activité moyenne des sidérophores produits par *P. aeruginosa* en fonction des différentes modalités d'inoculation : CL : cellules libres, CI : cellules immobilisées, lec : lait écrémé, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).



**Figure 3.32** : Activité moyenne des sidérophores produits par *P. fluorescens* en fonction des différentes modalités d'inoculation : CL : cellules libres, CI : cellules immobilisées, lec : lait écrémé, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).

La production spécifique des cellules libres de *P. aeruginosa* est supérieure à celle des cellules immobilisées dans les milieux sans Fe (**figures 3.33 et 3.34**). L'effet inverse est observé pour les milieux contenant du Fe pour les cellules immobilisées, ce qui confirme que l'adsorption de Fe sur les billes crée un gradient de concentration et limite la disponibilité en Fe pour les cellules immobilisées. Pour *P. fluorescens*, la production spécifique des cellules libres (CL) dans les milieux Fe et Fe-MT, n'est pas significativement différente de celle des cellules immobilisées (CI), sauf pour la modalité TIF Fe TM.

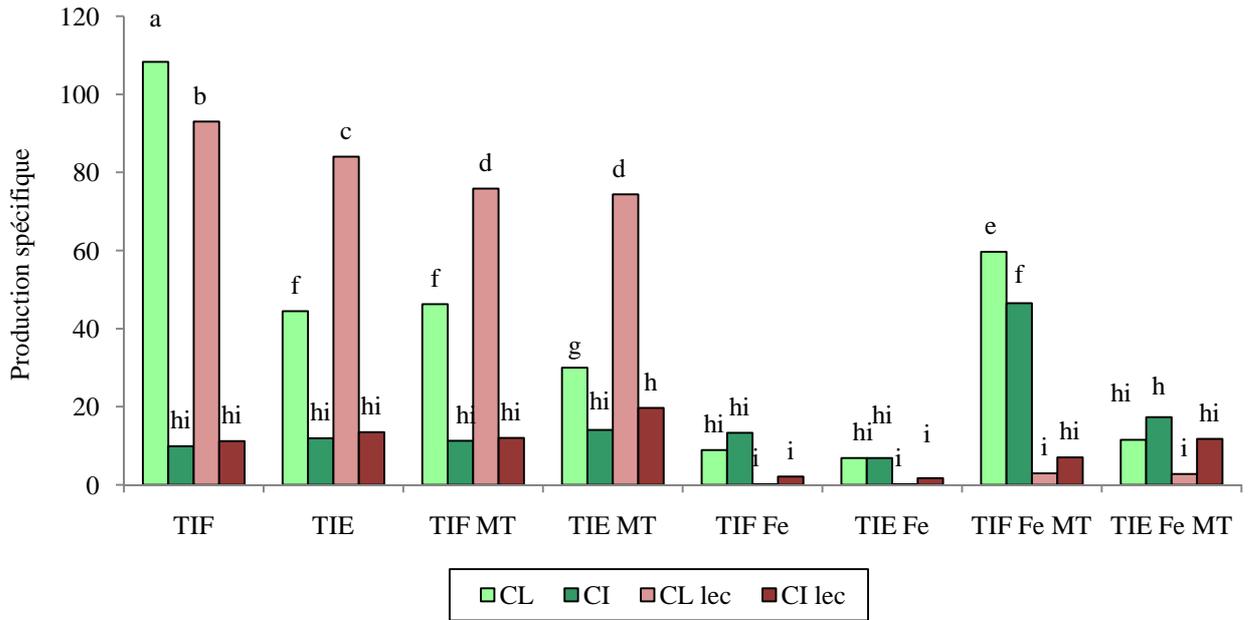
La présence de lait écrémé stimule globalement la production spécifique de *P. aeruginosa* sous forme immobilisée ou libre, en absence de Fe. Il faut cependant noter que la production spécifique de *P. aeruginosa* sous forme immobilisée avec ou sans lait écrémé ne varie pas significativement quelle que soit la modalité, excepté pour TIF Fe TM. L'immobilisation permet donc de conserver une production constante de sidérophores par cellule. Pour *P. fluorescens*, le lait écrémé n'augmente pas la production spécifique par rapport au témoin, excepté pour la modalité TIE.

### **CONCLUSION**

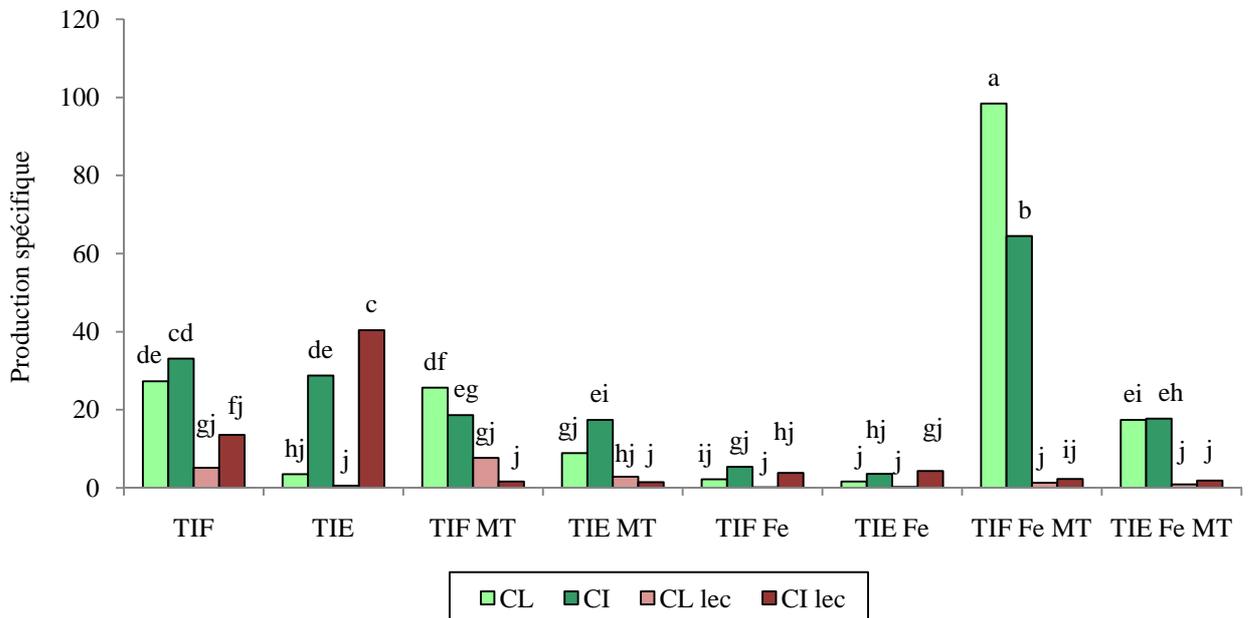
La production de sidérophores dans un milieu sans métaux est stimulée par l'ajout de mannitol, glycérol et fructose à 6,7 g/L pour les deux *Pseudomonas* étudiées ainsi que de lait écrémé pour *P. aeruginosa*. La production de sidérophores est globalement plus importante avec *P. aeruginosa* qu'avec *P. fluorescens*, et les deux bactéries produisent vraisemblablement une majorité de pyoverdine par rapport à la pyochéline, compte tenu des résultats obtenus avec le test CAS en présence de métaux (paragraphe 3.2).

En présence de métaux et de Fe, la croissance des deux bactéries en culture libre est stimulée par le fructose et le lait écrémé et la production de sidérophores par le fructose.

L'immobilisation de *P. aeruginosa* avec du lait écrémé stimule la production des sidérophores par rapport aux autres modalités dans un milieu contenant à la fois Fe et MT. Pour *P. fluorescens*, l'immobilisation dans le milieu Fe et MT augmente la production de sidérophores par rapport aux cellules libres bien que les différences observées ne soient pas significatives au vu de l'ANOVA, excepté pour TIF avec le lait écrémé. Cependant, en présence de MT, l'ajout de lait-écrémé a tendance à diminuer légèrement la production de sidérophores par *P. fluorescens* par rapport au milieu sans lait-écrémé.



**Figure 3.33 :** Production spécifique moyenne de *P. aeruginosa* en fonction des différentes modalités d'inoculation : CL : cellules libres, CI : cellules immobilisées, lec : lait écrémé, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).



**Figure 3.34 :** Production spécifique moyenne de *P. fluorescens* en fonction des différentes modalités d'inoculation : CL : cellules libres, CI : cellules immobilisées, lec : lait écrémé, indépendamment du facteur temps. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. TIF : taille inoculum faible, TIE : taille inoculum élevée, MT : mélange de métaux (Cr, Hg, Pb).

## 4. Test de phytoextraction sur sable/perlite

L'impact de l'inoculation de trois microorganismes producteurs de sidérophores (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *R. metallidurans*), a été testé sur les performances maximales de phytoextraction d'un mélange de Cr, Hg et Pb par du maïs (*Zea mays*), utilisé en tant que plante modèle. Un mélange sable/perlite stérilisé a été contaminé avec le mélange de métaux et incubé trois semaines avec chaque microorganisme. Le fait de travailler avec un substrat stérilisé permet de s'affranchir du facteur prédation par les protozoaires et/ou de la compétition vis à vis des microorganismes indigènes du sol.

La survie microbienne n'a pas été évaluée dans cette étude du fait de l'hétérogénéité du substrat. Le pH ne varie pas significativement entre le début (7,56) et la fin de l'expérience (7,45) quelque soit la modalité.

### 4.1. Production de biomasse végétale

La concentration en métaux utilisés pour cette étude (Cr : 5 mg/kg sable/perlite ; Hg : 0,2 mg/kg sable/perlite et Pb: 13 mg/kg sable/perlite) n'a pas d'effet toxique significatif sur la croissance des plantes non inoculées (pots témoins), par rapport au milieu sans métaux dans les pots témoins (**tableau III.25**).

L'inoculation des pots sans métaux avec *P. aeruginosa* et ceux avec métaux inoculés avec *P. fluorescens* se traduit par une augmentation significative de la biomasse foliaire et racinaire du maïs après 3 semaines de culture, par rapport au témoin non inoculé (**tableau III.25**). Ces microorganismes appartiennent en effet à des genres connus pour leur capacité à stimuler la croissance des végétaux, notamment celle de *Zea mays* (Egamberdiyeva *et al.* 2002). Cette augmentation peut s'expliquer par une meilleure assimilation des nutriments par la plante et/ou la production d'hormones de croissance par les microorganismes inoculés. La colonisation racinaire par *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* peut également jouer un rôle dans la croissance du végétal, grâce à la production de pyoverdines (Seong *et al.* 1991). La croissance du maïs est corrélée à la teneur en Fe du sol dont l'acquisition est elle-même fortement liée à l'activité microbienne du sol (Masalha *et al.* 2000), ce qui sous entend un rôle des sidérophores bactériens dans la nutrition ferrique du maïs. Ces métabolites microbiens pourraient avoir un rôle plus important dans la chélation du Fe que les phytosidérophores, car ces derniers peuvent être rapidement dégradés dans le sol par les microorganismes. Les ferri-sidérophores bactériens sont transportés dans la racine par diffusion passive vers la membrane plasmique des cellules racinaires où la réduction du FeIII en FeII libérerait les sidérophores (Marschner et Römheld 1994). Le rôle des sidérophores de type pyoverdine ou pyochéline dans la translocation du Fe n'a

cependant pas encore été démontré à ce jour.

**Tableau III.25** : Comparaison des valeurs moyennes de biomasse produite par le maïs en présence et en absence de métaux (Cr, Hg, Pb) et en fonction du microorganisme inoculé. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Valeurs moyennes	Masse de feuilles (g)		Masse de racines (g)	
	Sans métaux	Avec métaux	Sans métaux	Avec métaux
Témoin	0,178 (b)	0,108 (b)	0,143 (b'c')	0,137 (b'c')
<i>P. aeruginosa</i>	0,357 (a)	0,179 (b)	0,245 (a')	0,091 (c')
<i>P. fluorescens</i>	0,205 (b)	0,329 (a)	0,149 (b'c')	0,245 (a')
<i>R. metallidurans</i>	0,160 (b)	0,132 (b)	0,092 (c')	0,156 (b')

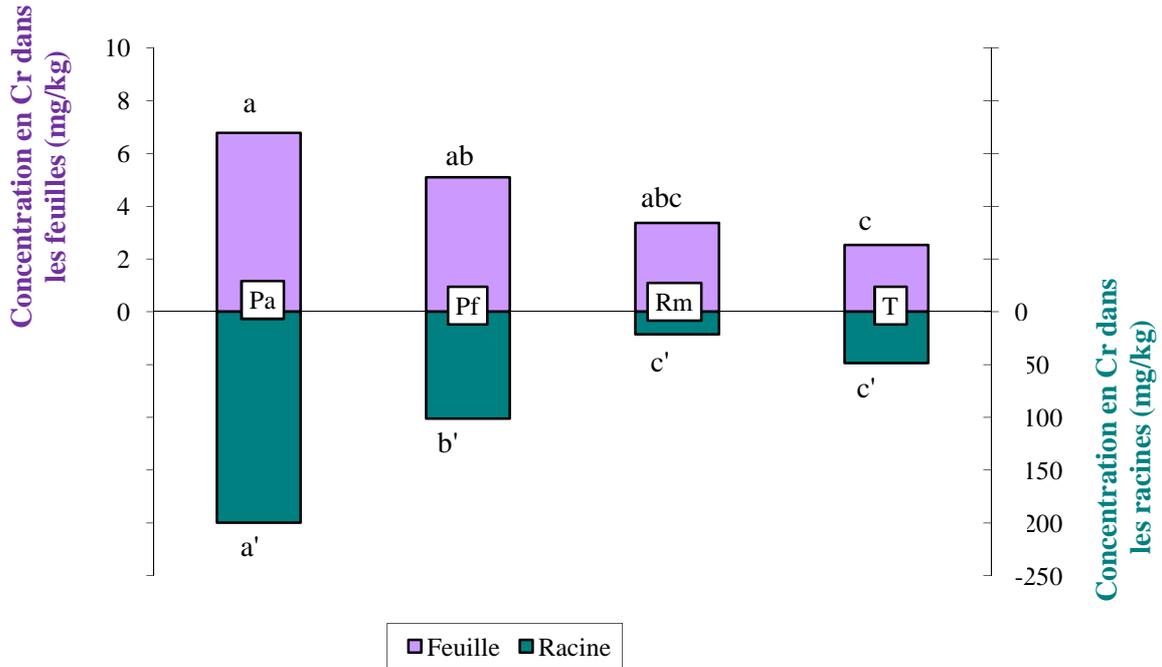
#### 4.2. Extraction de métaux

L'accumulation du Pb dans les feuilles de maïs des pots témoins est en moyenne 16 fois supérieure à celle du Cr (**figures 3.35 et 3.36**). La vitesse de phytoextraction du maïs pour le Pb (0,40 µg/j) est par conséquent largement supérieure à celle du Cr (0,04 µg/j).

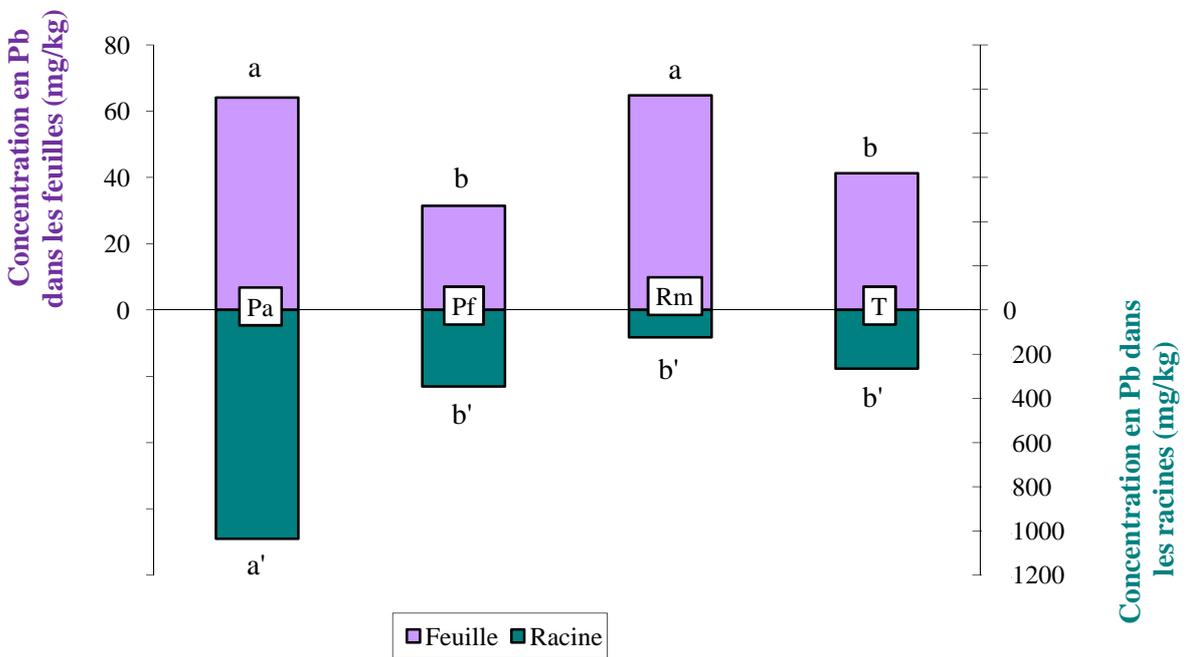
L'inoculation des pots avec *P. aeruginosa* ou *P. fluorescens* augmente significativement les teneurs en Cr dans les feuilles de maïs, de 2,7 et 2 fois respectivement, par rapport au témoin (**figure 3.35**). La même tendance s'observe pour le Cr dans les racines de maïs avec une augmentation significative des teneurs en Cr respectivement de 4,1 et 2,1 fois pour *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*.

La concentration en Pb dans les feuilles est supérieure à celle du témoin pour les pots inoculés avec *P. aeruginosa* et *R. metallidurans*, et dans les racines pour les pots inoculés avec *P. aeruginosa* (**figure 3.36**).

Pour le mercure, seule l'inoculation avec *P. aeruginosa* multiplie par 15 la concentration en Hg dans les racines de maïs par rapport au témoin qui contient 1,1 mg Hg /kg MS dans les racines (données non présentées). Les analyses n'ont cependant pas permis de détecter de mercure dans les feuilles. Peu de plantes peuvent accumuler le mercure dans leurs feuilles et une seule espèce, *Azolla caroliniana*, a été recensée comme hypercacumulatrice, c'est à dire capable d'accumuler dans ses feuilles plus de 10 mg de Hg/kg MS (Bennicelli *et al.* 2004).



**Figure 3.35 :** Teneurs en Cr dans les feuilles et racines de maïs en fonction du microorganisme inoculé. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (non inoculé).



**Figure 3.36 :** Teneurs en Pb dans les feuilles et racines de maïs en fonction du microorganisme inoculé. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (non inoculé).

L'augmentation de la biomasse foliaire et racinaire pour les pots inoculés avec *P. fluorescens* peut s'expliquer par une moindre accumulation en Pb dans la plante. Dans certains cas, les bactéries peuvent jouer le rôle de barrière en immobilisant les métaux et réduisant ainsi leur toxicité pour la plante (López *et al.* 2000; Mullen *et al.* 1989). L'augmentation de la biomasse racinaire pour les pots inoculés avec *P. fluorescens* ou *R. metallidurans* en présence de métaux par rapport aux pots sans métaux, peut être également due à l'épaississement des racines par subérisation en réaction à la toxicité métallique (Piechalak *et al.* 2002). L'accumulation élevée en métaux, notamment en Hg dans les racines du maïs inoculé avec *P. aeruginosa*, peut expliquer la faible biomasse racinaire produite par rapport au témoin sans métaux.

La quantité de Pb extraite par les feuilles et les racines de maïs est significativement supérieure à celle du témoin pour les pots inoculés avec *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* et avec *R. metallidurans* pour les quantités extraites par les feuilles (**tableau III.26**). L'inoculation avec *P. aeruginosa* permet en effet d'extraire 2,7 fois plus de Pb par les feuilles que le témoin. En revanche l'extraction du Cr par les feuilles de maïs dans les pots inoculés n'est pas significativement différente du témoin bien que l'inoculation des pots avec *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* augmente les quantités de Cr extraites par les racines. La disponibilité quasi totale des métaux ajoutés au mélange sable/perlite démontrée dans l'étude de Srivastava *et al.* (1999) ou Mishra *et al.* (1995) fait que l'effet des microorganismes sur la mobilité du Cr n'est pas significatif par rapport au témoin. Les résultats obtenus pour le Hg ne sont pas significativement différents entre eux bien que l'inoculation de *P. aeruginosa* augmente la quantité de Hg extrait par les racines. La variabilité importante des résultats pour le Hg peut expliquer cette absence de différences significatives.

**Tableau III.26** : Comparaison des valeurs moyennes des quantités de métaux extraites (en µg/plante) par les feuilles et les racines de maïs en fonction du microorganisme inoculé. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Métal extrait (µg/plante)	Feuilles		Racines		
	Cr	Pb	Cr	Hg	Pb
Témoin	0,26 (d)	4,20 (c)	6,84 (d')	0,17 (e')	37,03 (b')
<i>P. aeruginosa</i>	1,20 (d)	11,51 (a)	18,10 (c')	1,47 (e')	94,04 (a')
<i>P. fluorescens</i>	1,57 (d)	10,29 (ab)	24,20 (c')	0,25 (e')	81,94 (a')
<i>R. metallidurans</i>	0,43 (d)	8,36 (b)	3,57 (d')	0,11 (e')	21,04 (b')



L'inoculation du maïs avec *R. metallidurans* permet d'augmenter significativement le facteur de translocation (FT)<sup>\*</sup> du Pb et du Cr, par rapport au témoin (**tableau III.27**). L'effet de l'inoculation de *R. metallidurans* sur la phytoextraction de métaux n'ayant pas fait l'objet de publication à ce jour, il est difficile d'affirmer que l'augmentation de la translocation est due à la production de métabolites. Le sidérophore majoritaire produit par *R. metallidurans*, l'alcaligine E, peut mobiliser Cd, Pb et Zn dans un sol (Diels *et al.* 1999), mais il n'existe pas encore de données sur les éventuelles interactions avec Cr ou Hg. Le FT du Pb est supérieur d'un facteur 2 à 3 à celui du Cr pour le témoin et les pots inoculés avec *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *R. metallidurans*. Le Cr est à la fois moins accumulé que le Pb dans les feuilles et les racines mais également plus difficilement transloqué en raison de sa forte affinité pour les parois des cellules végétales (Aldrich *et al.* 2003). La séquestration passive fait en effet partie des mécanismes de résistance de la plante qui peuvent limiter le transfert des métaux (Turner 1994).

**Tableau III.27** : Valeurs moyennes du facteur de translocation (FT) du Cr et de Pb en fonction du microorganisme inoculé. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Valeurs moyennes	FT Cr	FT Pb
Témoin	0,051 (b)	0,159 (b')
<i>P. aeruginosa</i>	0,033 (b)	0,063 (b')
<i>P. fluorescens</i>	0,052 (b)	0,125 (b')
<i>R. metallidurans</i>	0,181 (a)	0,625 (a')

Le facteur de bioaccumulation (FB)<sup>\*</sup> du Cr est significativement supérieur à celui du témoin avec *P. aeruginosa*, et celui du Pb avec *P. aeruginosa* et *R. metallidurans* (**tableau III.28**).

**Tableau III.28** : Valeurs moyennes du facteur de bioaccumulation (FB) de Cr et de Pb pour les feuilles de maïs en fonction du microorganisme inoculé. Les lettres correspondent aux groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

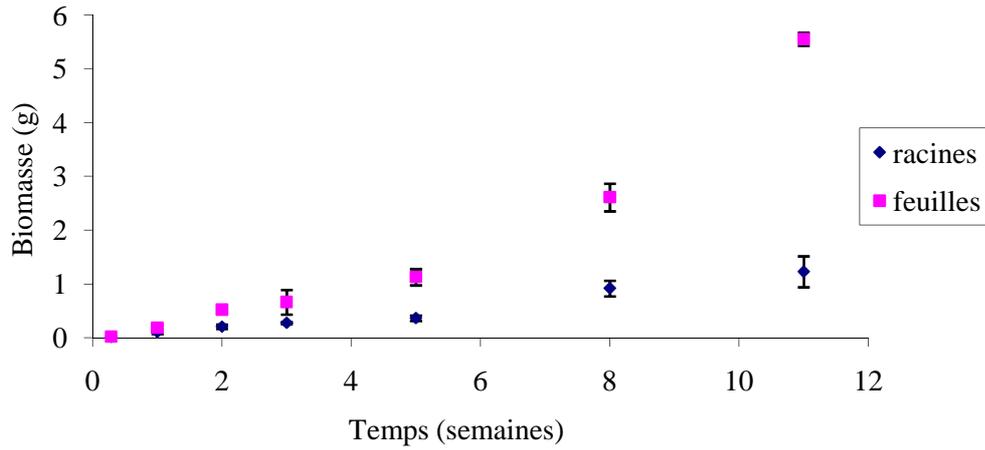
Valeurs moyennes	FB Cr	FB Pb
Témoin	0,552 (bc)	2,939 (b')
<i>P. aeruginosa</i>	1,471 (a)	4,564 (a')
<i>P. fluorescens</i>	1,105 (ab)	2,239 (b')
<i>R. metallidurans</i>	0,732 (ac)	4,612 (a')

\* Voir glossaire

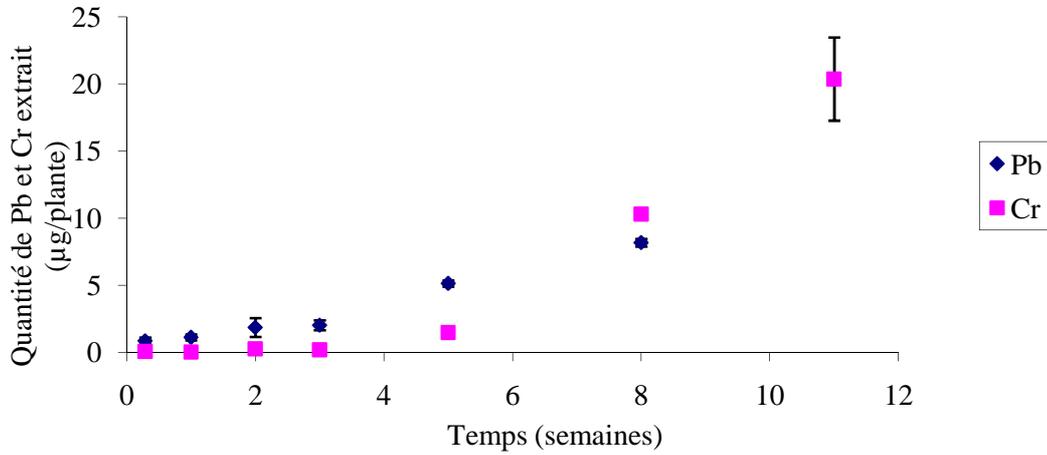
### CONCLUSION

L'extraction du Pb par le maïs cultivé sur un substrat sable/perlite stérilisé est plus efficace que celle du Cr, non seulement en ce qui concerne le facteur de bioaccumulation mais également le facteur de translocation. L'inoculation avec *P. aeruginosa*, *R. metallidurans* et *P. fluorescens* permet d'augmenter les teneurs en Cr et/ou en Pb dans les feuilles du maïs, *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* étant plus efficaces pour l'extraction du Cr et *P. aeruginosa* et *R. metallidurans* pour l'extraction du Pb. Le FT du Cr et du Pb est de plus 3 et 4 fois supérieur au témoin, respectivement, pour les pots inoculés avec *R. metallidurans*. Cette étude confirme celle d'Höflich et Metz (1997) qui avaient démontré que l'inoculation de *Zea mays* avec des bactéries du genre *Pseudomonas* augmentait la production de biomasse végétale et le prélèvement de Cd, Cu, Ni, Pb et Zn.

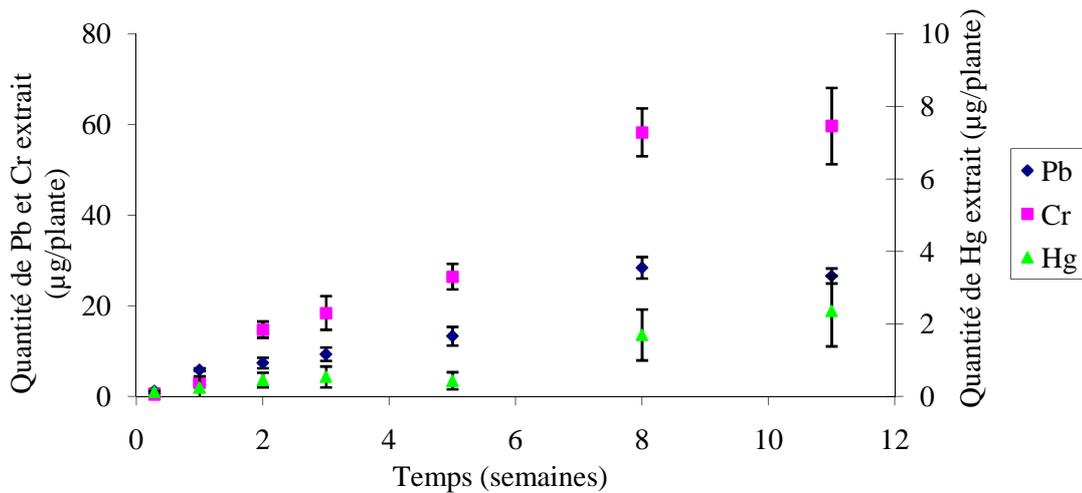
Cette étude réalisée dans des conditions favorables au développement des microorganismes inoculés a été mise en œuvre et optimisée dans le sol pour augmenter le rendement de phytoextraction.



**Figure 3.37:** Biomasses foliaire et racinaire du maïs en fonction du temps. Les barres verticales représentent les écart-types.



**Figure 3.38 :** Accumulation du Cr, Hg et Pb dans les feuilles de maïs. Les barres verticales représentent les écart-types.



**Figure 3.39 :** Accumulation du Cr, Hg et Pb dans les racines de maïs. Les barres verticales représentent les écart-types.

## 5. Test de phytoextraction en microcosmes de sol

### 5.1. Cinétique de phytoextraction

L'accumulation du Cr, Hg et Pb a été suivie pendant 11 semaines dans du maïs cultivé en logette climatisée dans des pots de terre contenant le sol B. La spéciation des métaux dans le sol a également fait l'objet d'un suivi au cours du temps. La fraction dite bioaccessible a notamment été déterminée au moyen de plusieurs extractants.

La production de biomasse foliaire augmente de façon exponentielle à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine pour atteindre 5,5 g de matière sèche (MS) pour les feuilles et 1,2 g MS pour les racines après 11 semaines (**figure 3.37**).

La quantité de Pb et de Cr accumulée dans les feuilles est de 20 µg/plante environ au bout de 11 semaines, bien que la quantité de Pb accumulée soit légèrement supérieure à celle du Cr le au début de la cinétique (**figure 3.38**). La quantité de Cr et de Pb accumulée dans les racines semble atteindre un plateau à 8 semaines de culture avec respectivement 8,4 et 26,6 µg/plante. La quantité de Hg n'est pas détectable dans les feuilles. En revanche, la quantité de Hg extraite par les racines de maïs atteint 2,3 µg/plante au bout de 11 semaines (**figure 3.39**).

Les vitesses d'extraction présentées dans le **tableau III.29** correspondent à la quantité de métal extrait entre deux temps de prélèvement. La vitesse d'extraction du Pb est globalement plus élevée dans les feuilles que celle du Cr. Cette vitesse est en revanche supérieure pour le Cr dans les racines ce qui traduit la difficulté qu'ont les métaux à être transloqués vers les feuilles. La vitesse de prélèvement du mercure par les racines est très faible, conséquence de l'incapacité de la plante à le prélever efficacement et à l'accumuler.

**Tableau III.29** : Vitesses d'extraction des métaux (µg/j) dans les feuilles et racines de maïs sur 11 semaines et moyenne par semaine.

Temps (semaine)	Feuilles		Racines		
	Pb (µg/j)	Cr (µg/j)	Pb (µg/j)	Cr (µg/j)	Hg (µg/j)
0,3	0,43	0,04	0,62	0,22	0,06
1	0,05	0	0,93	0,52	0,02
2	0,11	0,04	0,21	1,67	0,03
3	0,02	0	0,28	0,53	0,01
5	0,22	0,09	0,28	0,57	0
8	0,14	0,42	0,72	1,52	0,06
11	0,58	0,48	0	0,06	0,03
<b>Moyenne</b>	0,22	0,15	0,42	0,73	0,03

Une étude sur le maïs a montré que l'accumulation du Pb dans les feuilles atteignait son maximum au bout de 15 semaines avec 80 µg/plante, alors que la vitesse maximale d'extraction était atteinte au bout de 9 semaines avec environ 1,6 µg/j de Pb (Brennan et Shelley 1999). Cette

étude a cependant été réalisée sur un sol contaminé avec 2500 mg/kg de Pb, ce qui explique les différences observées avec les résultats présentés ici.

Pour la suite des expérimentations, le maïs a été récolté à 8 semaines car cette durée est un compromis entre une extraction maximale par les racines, tout en étant élevée pour la biomasse foliaire, et le maintien de conditions optimales de fonctionnement du système racinaire. En effet à ce stade, les pots sont encore de taille suffisante pour éviter toute compression des racines.

Plusieurs études ont montré que des extractants pouvaient renseigner efficacement sur la phytodisponibilité, comme par exemple le  $\text{CaCl}_2$  pour Pb ( $r=0,954$ ) et Cr ( $r=0,951$ ) avec *Sesamum indicum* (Gupta et Sinha 2006) ou le mélange Rhizo composé de différents acides organiques (voir matériel et méthode) avec le Pb pour le blé d'hiver ( $r=0,438$ ) (Feng *et al.* 2005). Ces relations dépendent cependant fortement du type de plante ainsi que des propriétés du sol, notamment du pH.

Pour notre étude, les concentrations en Cr et Pb du sol obtenues avec les différents extractants ( $\text{CaCl}_2$ , DTPA, eau ultra pure, Rhizo,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ ) ne sont pas corrélées significativement ou corrélées négativement aux teneurs en Cr, Pb, Hg des feuilles et des racines de maïs, excepté pour l'extraction de Cr avec l'eau ultra pure (EUP) (0,659) et l'extraction de Pb (0,570) et Hg (0,489) avec  $\text{MgCl}_2$  (**tableau III.30**). Ainsi ces extractants ne permettent pas pour cette étude d'évaluer la phytodisponibilité des métaux. Seule l'utilisation de  $\text{MgCl}_2$  pour la spéciation de Pb pour les expériences suivantes permettra d'évaluer la mobilité de ces métaux dans le sol.

La concentration en Pb dans les racines est corrélée significativement à la concentration en Pb dans les feuilles de maïs ( $r=0,704$ ). Cela peut signifier que le Pb est absorbé et transloqué de façon passive et est moins retenu par les racines que le Cr dont le coefficient de corrélation entre la concentration en Cr dans les feuilles et les racines est négatif ( $r = -0,272$ ). En effet le facteur de translocation (ou de transfert) du Pb dans le maïs est en moyenne de 0,33 contre 0,22 pour le Cr après 8 semaines de culture.

**Tableau III.30** : Coefficients de corrélations de Pearson entre les teneurs en métaux extraits du sol et les teneurs en métaux dans les parties végétales du maïs. Les valeurs en gras sont significatives au seuil de 0,05.

Extractants	Concentration en Cr (mg/kg MS)		Concentration en Pb (mg/kg MS)		Concentration en Hg (mg/kg MS)	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
CaCl <sub>2</sub>	0,311	<b>-0,452</b>	0,096	0,153	-	-
DTPA	0,426	-0,380	0,150	0,418	-	-
EUP	<b>0,659</b>	-0,210	-0,198	-0,100	-	-
Rhizo	0,052	0,287	<b>-0,481</b>	-0,278	-	-
NaNO <sub>3</sub>	0,414	<b>-0,557</b>	-0,003	0,065	-	-
MgCl <sub>2</sub>	0,116	<b>-0,573</b>	0,387	<b>0,570</b>	-	<b>0,489</b>
Concentration en métal dans les feuilles (mg/kg MS)	-	-0,272	-	<b>0,704</b>	-	-

En conclusion de cette étude préliminaire, nous avons estimé que la durée de notre expérience de phytoextraction serait de 8 semaines et que l'extractant le plus indiqué en particulier pour Hg et Pb, serait le MgCl<sub>2</sub> de la méthode d'extraction de Tessier.

## 5.2. Optimisation de la survie des microorganismes inoculés.

Le principal facteur d'échec de la bioaugmentation vient du stress auquel sont soumis les microorganismes inoculés dans des matrices environnementales (sols, sédiments) : oligotrophie, présence de prédateurs, compétition pour les substrats vis à vis des autres microorganismes (Goldstein *et al.* 1985). Nous avons testé différentes formulations d'inocula de façon à augmenter à la fois la survie microbienne dans le sol et le stock de métaux à disposition de la plante.

L'immobilisation microbienne dans des supports adaptés favorise d'une part l'adaptation des microorganismes inoculés à leur nouvel environnement grâce à la protection temporaire fournie par le support et permet d'autre part, leur relargage hors de la matrice d'immobilisation afin de favoriser leur dissémination dans le sol. Un autre avantage de l'immobilisation vient d'un risque moindre de lessivage permettant de conserver les microorganismes inoculés dans la zone racinaire (van Elsas *et al.* 1992).

Les trois microorganismes sélectionnés à partir des chapitres précédents : *P. aeruginosa*, *R. metallidurans* et *P. fluorescens*, ont été inoculés individuellement dans le sol B sous forme de cellules libres (CL) sans substrat ou avec du lait écrémé (CL lec). Le lait écrémé a en effet

montré qu'il pouvait favoriser la croissance des *Pseudomonas* mais également la production de sidérophores (voir paragraphe 3.3). L'immobilisation microbienne dans des billes d'alginate de calcium sans (CI) ou avec substrat (CI lec) a également été testée. Un témoin (T) non inoculé a été réalisé pour chaque modalité.

### 5.2.1. Analyses de pH et Eh

Le pH du sol témoin a globalement tendance à rester stable ou à diminuer légèrement entre T0 et le temps final de l'expérience (TF) à 8 semaines (**tableau III.31**).

L'inoculation des sols avec les cellules libres (CL) et *P. aeruginosa* pour la modalité CI lec a tendance à augmenter le pH par rapport au témoin à TF. Cette augmentation peut s'expliquer par l'adsorption de H<sup>+</sup> sur les parois bactériennes (Daughney et Fein 1998). Ces protons, comme ceux adsorbés sur les particules de sol et la matière organique ne sont pas pris en compte car le pH (eau) ne considère que les protons en solution. En revanche, le pH des pots inoculés avec *R. metallidurans* CL lec, *R. metallidurans* CI et *P. fluorescens* CI diminue par rapport au témoin. Globalement, il semble que les différentes modalités, indépendamment du type de souche inoculée, n'aient pas d'impact significatif sur le pH du sol

**Tableau III.31** : Valeurs moyennes de pH en fonction des différentes modalités d'inoculation entre le début (T0) et la fin de l'expérience (TF). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Valeurs moyennes de pH	CL	CL lec	CI	CI lec
Témoin (T0)	6,38 (b)	6,55 (a)	6,30 (bc)	6,34 (b)
Témoin (TF)	5,83 (e)	6,47 (ab)	6,42 (ab)	6,16 (cd)
<i>P. aeruginosa</i> (TF)	6,34 (b)	6,36 (b)	6,40 (ab)	6,34 (b)
<i>P. fluorescens</i> (TF)	6,34 (b)	6,31 (bc)	6,15 (cd)	6,12 (d)
<i>R. metallidurans</i> (TF)	6,05 (d)	6,06 (d)	6,15 (cd)	6,06 (d)

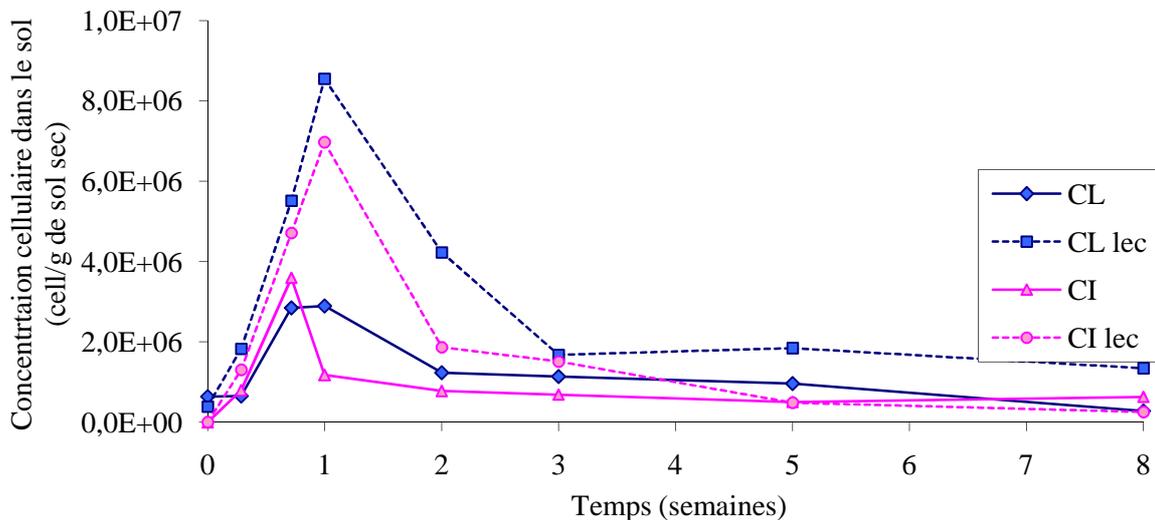
Le potentiel redox entre T0 et TF augmente en moyenne pour le témoin et diminue ou reste stable pour les sols inoculés (**tableau III.32**). Le facteur inoculation a peu d'effet sur les variations de Eh, excepté pour les pots inoculés avec *Pseudomonas aeruginosa*, dans lesquels le potentiel redox tend à diminuer par rapport au témoin, ce qui peut être relié à sa concentration cellulaire plus élevée que celle des autres bactéries et par conséquent à une consommation accrue d'oxygène (voir figure 3.4.1).

**Tableau III.32** : Valeurs moyennes du potentiel redox (Eh) en fonction des différentes modalités d'inoculation entre le début (T0) et la fin de l'expérience (TF). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Valeurs moyennes de Eh	CL	CL lec	CI	CI lec
Témoin (T0)	326 (bd)	341 (ac)	306 (cd)	327 (bd)
Témoin (TF)	341 (ac)	340 (ac)	324 (bd)	368 (a)
<i>P. aeruginosa</i> (TF)	273 (e)	278 (e)	311 (cd)	322 (bd)
<i>P. fluorescens</i> (TF)	344 (ac)	309 (cd)	300 (de)	323 (bd)
<i>R. metallidurans</i> (TF)	331 (bd)	344 (ac)	353 (ab)	352 (ab)

### 5.2.2. Analyses microbiologiques

La croissance des microorganismes inoculés marqués à la GFP est suivie dans le sol durant 8 semaines. La croissance de ces microorganismes est maximale entre 5 et 7 jours, en particulier dans les milieux avec lait écrémé, puis le nombre de microorganismes diminue progressivement (**figure 3.40**). La concentration cellulaire dénombrée à T0 est inférieure à la concentration théorique inoculée ( $6,7 \cdot 10^7$  cellules/mL) en raison de la technique d'extraction employée dont le rendement est peu élevé. Ce résultat n'est pas propre à notre étude puisque la plupart des études s'accordent sur un rendement d'extraction de bactéries du sol de quelques pourcents (Lindhal et Bakken, 1995). Néanmoins, le protocole étant répété de façon uniforme, la mesure permet de comparer tous les prélèvements.

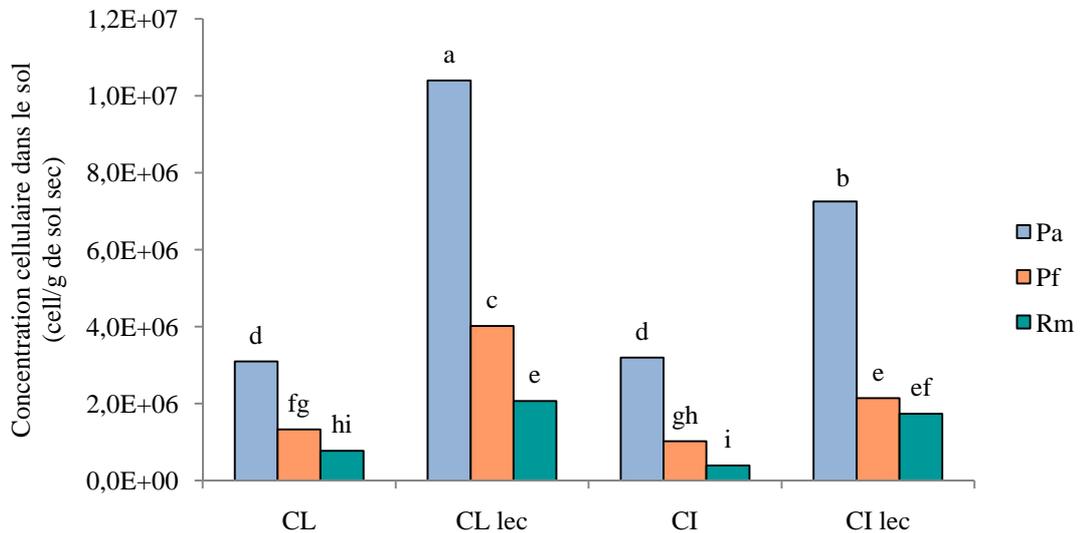


**Figure 3.40** : Cinétique de croissance de *P. fluorescens* inoculé dans le sol. CL : cellules libres, CL lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé. Les barres verticales représentent les écart-types.



Globalement l'inoculation de *P. aeruginosa* est la plus efficace. Le nombre de cellules est en moyenne 2,8 fois supérieur à celui de *P. fluorescens* et 5,3 fois à celui de *R. metallidurans* (**figure 3.41**). Pour les trois microorganismes, la concentration cellulaire pour la modalité CI sans lait écrémé n'est pas significativement différente de celle des CL. Les billes d'alginate sont effectivement dégradées assez rapidement dans le sol, au bout d'une semaine environ, probablement du fait de la consommation de l'alginate par les microorganismes indigènes.

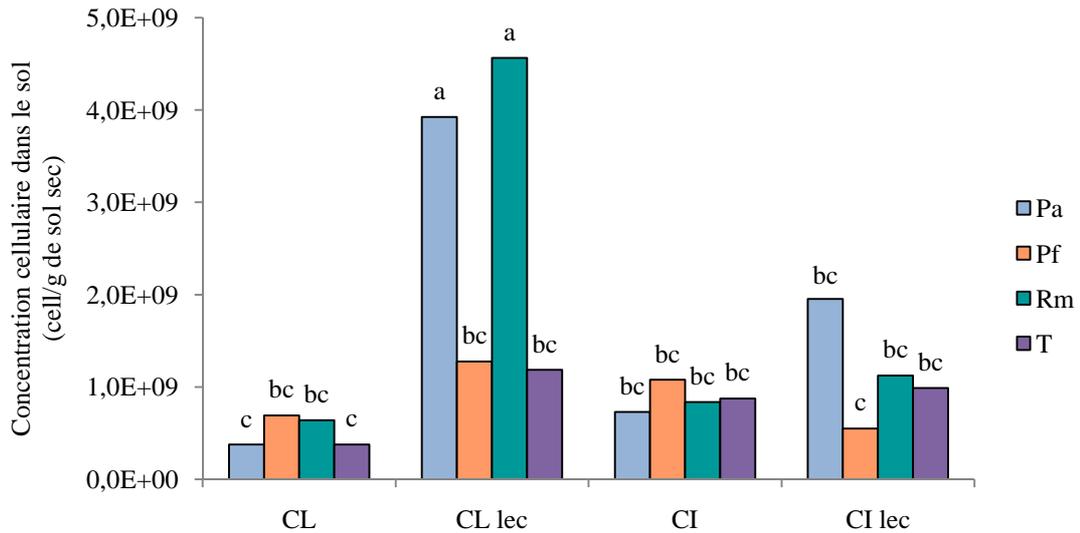
Le traitement le plus efficace en terme de survie microbienne pour les trois microorganismes est celui avec les cellules libres et le lait écrémé (CL lec), excepté pour *R. metallidurans* pour qui le traitement avec CI lec donne la même concentration. Le lait écrémé inclus dans les billes d'alginate est sans doute moins accessible que mélangé directement au sol, mais par ailleurs, il n'est pas consommé prioritairement par les microorganismes indigènes au détriment de ceux inoculés.



**Figure 3.41** : Concentration moyenne en cellules inoculées dans le sol, en fonction de la technique d'inoculation, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

La croissance des microorganismes hétérotrophes totaux (MHT) est maximale en moyenne après 2j d'incubation, excepté pour la modalité CL lec pour laquelle la concentration maximale en MHT est atteinte après 5j d'incubation et pour les pots inoculés avec *R. metallidurans* dont le pic de croissance des MHT est atteint après 1 à 2 semaines d'incubation (données non présentées). Globalement les concentrations en microorganismes hétérotrophes totaux des sols inoculés ne sont pas significativement différentes du témoin excepté pour les sols inoculés avec *R. metallidurans* et *P. aeruginosa* pour lesquels le nombre de MHT pour la

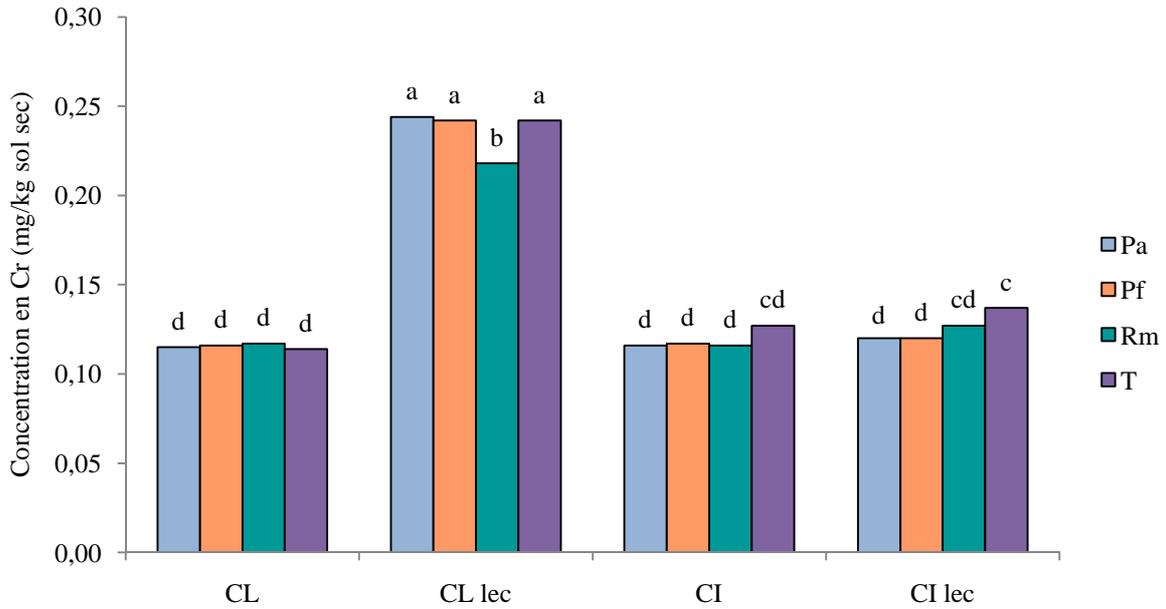
modalité CL lec est 3,8 et 3,3 fois supérieur, respectivement, par rapport au témoin (**figure 3.42**). Cette augmentation ne correspond pas uniquement à la biomasse supplémentaire liée à l'inoculation puisque les microorganismes dénombrés grâce à la GFP sont au maximum de  $5,9 \cdot 10^6$  et  $4,6 \cdot 10^7$  cellules/g de sol respectivement pour *R. metallidurans* et *P. aeruginosa* alors que l'augmentation des MHT correspond environ à  $3,4 \cdot 10^9$  et  $2,7 \cdot 10^9$  cellules/g de sol respectivement. L'inoculation de ces bactéries ainsi que la présence de lait écrémé a pu ainsi stimuler le développement d'autres populations dans le sol.



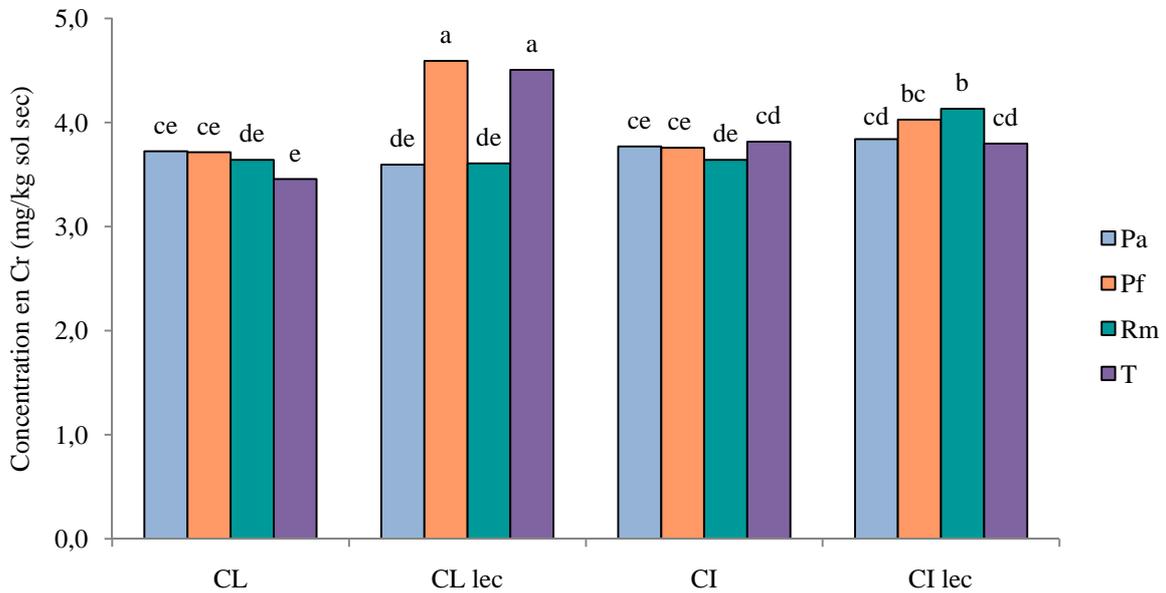
**Figure 3.42** : Concentration moyenne en microorganismes hétérotrophes totaux du sol en fonction des différents traitements, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : sol non inoculé. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

### 5.2.3. Analyse des fractions métalliques F1 et F2

L'inoculation du sol avec les microorganismes sélectionnés, quelque soit la modalité, ne permet pas d'augmenter significativement la teneur en Cr dans la fraction F1 du sol, c'est à dire la fraction échangeable, par rapport au témoin (**figure 3.43**). L'inoculation avec *R. metallidurans* pour la modalité CL lec ou avec *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* pour la modalité CI lec diminue même légèrement la concentration en Cr dans F1 par rapport au témoin. En revanche, l'ajout de lait écrémé mélangé au sol, pour les sols inoculés ou non, augmente la teneur en Cr dans la fraction F1, quelle que soit la technique d'inoculation. Cette augmentation pourrait être attribuée à l'effet du lait écrémé sur les microorganismes indigènes du sol qui ont pu contribuer à augmenter la mobilité du Cr.



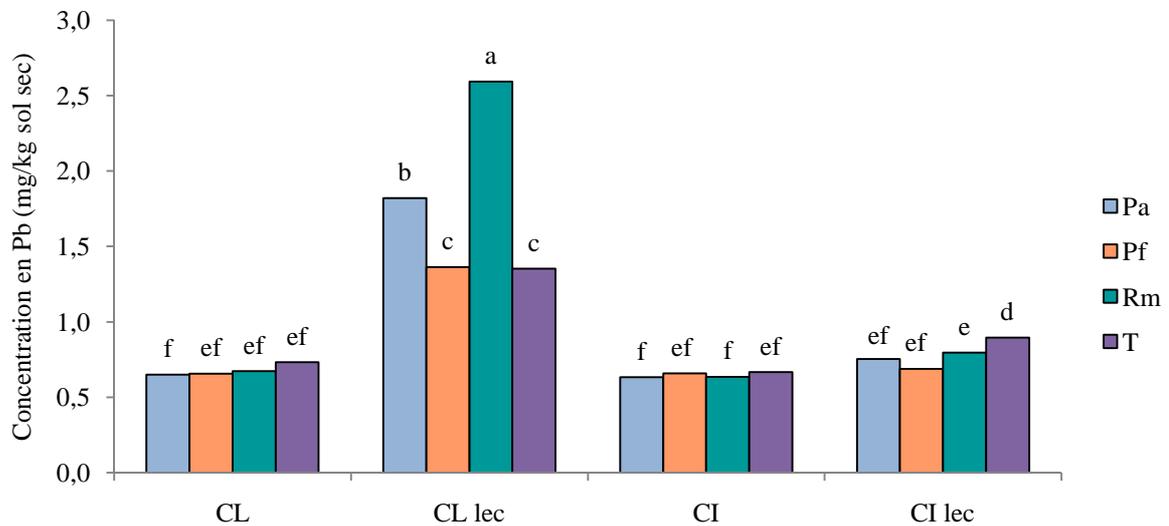
**Figure 3.43** : Concentration moyenne en Cr dans la fraction F1 du sol, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : sol non inoculé. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.



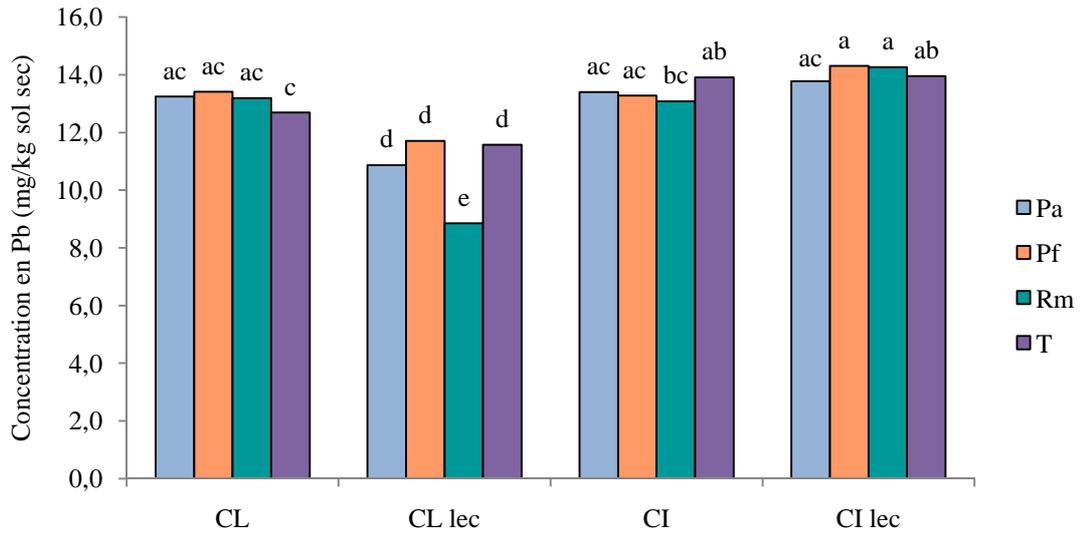
**Figure 3.44** : Concentration moyenne en Cr dans la fraction F2 du sol, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : sol non inoculé. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

La concentration en Cr dans la fraction F2 du sol (fraction liée aux carbonates) n'est pas non plus significativement supérieure au témoin excepté pour le sol inoculé avec *R. metallidurans* pour la modalité CI lec (**figure 3.44**). Une réduction de la concentration en Cr dans la fraction F2 est même observée pour CL Lec avec *P. aeruginosa* et *R. metallidurans*. Comme pour F1, la technique d'inoculation a plus d'impact sur le Cr dans F2 que le type de microorganisme inoculé. L'ordre d'efficacité pour la mobilisation du Cr de la fraction F2 est le suivant : CL lec > CI lec > CI > CL.

Seule l'inoculation du sol avec *P. aeruginosa* et *R. metallidurans* pour la modalité CL lec permet d'augmenter la teneur en Pb dans la fraction F1 (**figure 3.45**). Pour la fraction F2, seule une diminution de la concentration en Pb est observée dans le sol inoculé par *R. metallidurans* pour la modalité CL lec (**figure 3.46**). Cette diminution est probablement la conséquence de l'augmentation observée dans la fraction F1 pour la même modalité. De même la technique d'inoculation joue un rôle sur le transfert des métaux d'une fraction métallique à l'autre : l'augmentation moyenne pour le Pb de la fraction F1 observée pour la modalité CL lec par rapport à la modalité CL est de 1,10 mg/kg sol sec et la diminution moyenne entre la modalité CL lec et la modalité CL pour Pb F2 est de 0,94 mg/kg. Cette diminution pourrait alors s'expliquer par le transfert d'une partie de PbF2 vers PbF1, d'où l'augmentation observée pour PbF1 pour la modalité CL lec.



**Figure 3.45** : Concentration moyenne en Pb dans la fraction F1 du sol, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : sol non inoculé. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.



**Figure 3.46** : Concentration moyenne en Pb dans la fraction F2 du sol, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d’après l’ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : sol non inoculé. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

#### 5.2.4. Analyse globale des facteurs régissant la mobilité des métaux

Le **tableau III.33** présente la matrice de corrélation regroupant les différents paramètres étudiés. Le pH est corrélé positivement au Cr dans les fractions F1 et F2, or c’est en théorie lorsque le pH augmente que le Cr et le Pb sont moins mobiles et devraient donc être moins présents dans ces fractions.

Le potentiel redox est corrélé négativement au nombre de microorganismes inoculés (MI) ce qui était attendu puisque l’augmentation de la biomasse microbienne des MI et donc de la respiration microbienne abaisse le potentiel redox. La production de sidérophores tel que la pyoverdine peut également conduire à une diminution du potentiel redox du sol du fait du prélèvement de  $Fe^{3+}$  (Pidello 2003).

Les quantités de Cr dans la fraction F1 sont positivement corrélées à la quantité de Pb dans cette même fraction (0,815). Cette corrélation pourrait signifier que l’évolution du Cr et de Pb dans le sol d’étude est la même dans les fractions dites bioaccessibles, et que leur mobilité est régie par les mêmes mécanismes.

La quantité de Cr et de Pb dans la fraction F1 est influencée positivement par le nombre de microorganismes hétérotrophes totaux (MHT) (0,600 et 0,808 respectivement). Par contre, lorsque le nombre de MHT augmente, la concentration en Pb dans F2 diminue (-0,689), ce qui

pourrait s'expliquer par la biosorption ou la bioaccumulation de ces métaux par les microorganismes.

De même le nombre de microorganismes inoculés (MI) est positivement corrélé au Cr (0,343) et au Pb (0,287) dans la fraction F1. Cependant ces coefficients de corrélation sont inférieurs à ceux obtenus pour les MHT. Cela signifierait que les MHT sont majoritairement responsables de la mobilisation de Cr et Pb dans F1 par rapport aux MI. Cette influence peut s'expliquer par l'apport d'un substrat non spécifique, le lait écrémé, qui ajouté en mélange au sol pour la modalité CL le favorise les microorganismes indigènes, indépendamment des microorganismes inoculés.

**Tableau III.33** : Matrice de corrélation donnant les coefficients de Pearson. Les valeurs en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$ . MHT : microorganismes hétérotrophes totaux, MI : microorganismes inoculés.

	pH	Eh	CrF1	CrF2	PbF1	PbF2	MHT	MI
pH	1							
Eh	<b>-0,373</b>	1						
CrF1	<b>0,297</b>	-0,160	1					
CrF2	<b>0,345</b>	0,019	<b>0,447</b>	1				
PbF1	0,009	-0,006	<b>0,815</b>	0,074	1			
PbF2	-0,024	0,100	<b>-0,758</b>	0,046	<b>-0,896</b>	1		
MHT	0,043	-0,121	<b>0,600</b>	-0,100	<b>0,808</b>	<b>-0,689</b>	1	
MI	<b>0,337</b>	<b>-0,570</b>	<b>0,343</b>	-0,098	<b>0,287</b>	-0,251	<b>0,523</b>	1

### CONCLUSION

La survie des microorganismes inoculés dans le sol est favorisée par l'ajout de lait écrémé plus que par la technique d'inoculation (microorganismes libres ou immobilisés). Cependant l'ajout de substrat directement au sol profite également à la croissance des microorganismes indigènes alors que la co-localisation du lait écrémé dans les billes d'alginate favorise surtout la croissance des microorganismes inoculés au détriment des microorganismes indigènes. L'effet de l'immobilisation est réduit du fait de la vitesse de dégradation des billes d'alginate dans le sol, qui disparaissent au bout d'une semaine.

L'inoculation des microorganismes n'a pas d'effet significatif sur la teneur en Cr dans les fractions métalliques les plus mobiles du sol c'est à dire F1 et F2. Par contre, pour les modalités avec cellules libres, l'ajout de lait écrémé ajouté directement au sol multiplie par 2 la teneur en Cr dans la fraction F1 par rapport au sol sans lait écrémé, et augmente également les teneurs en Cr dans F2. Pour le Pb, l'ajout de lait écrémé directement au sol augmente la concentration de Pb dans F1 mais diminue la concentration en Pb dans la fraction F2, que le sol soit inoculé ou non. L'inoculation du sol avec des cellules libres de *P. aeruginosa* et *R. metallidurans* pour la modalité avec lait écrémé augmente respectivement par 1,3 et 1,9 les teneurs en Pb dans la fraction F1.

Globalement le traitement le plus efficace en terme de survie microbienne et d'augmentation de la mobilité des métaux dans le sol est donc le traitement avec conjointement les cellules libres et le lait écrémé, en particulier avec *P. aeruginosa* et *R. metallidurans*.

### 5.3. Phytoextraction couplée à la bioaugmentation du sol agricole

L'expérience de phytoextraction couplée à la bioaugmentation est réalisée avec les mêmes modalités que précédemment (microorganismes testés, technique d'inoculation, et durée de l'expérience). La plante modèle utilisée est le maïs (*Zea mays* L.). La bioaugmentation du sol est réalisée avec deux microorganismes connus pour être rhizosphériques du maïs (*P. aeruginosa* et *P. fluorescens*) et un microorganisme non rhizosphérique du maïs (*R. metallidurans*). L'avantage de l'inoculation d'un microorganisme non rhizosphérique est que son spectre d'action est potentiellement plus large dans le sol que les autres bactéries si celles-ci ne colonisent que les racines.

#### 5.3.1. Analyses de pH et Eh

Comme pour l'expérience sans plante, le pH diminue entre T0 et TF quelle que soit la modalité (**tableau III.34**). Le pH (eau) des modalités avec lait écrémé est significativement inférieur à celui des modalités sans lait écrémé. De même l'inoculation du sol avec les bactéries pour les modalités avec lait écrémé, diminue de façon significative le pH par rapport au témoin, en particulier les sols inoculés avec *P. aeruginosa*.

**Tableau III.34** : Valeurs moyennes du pH (eau) en fonction des différentes techniques d'inoculation entre le début (T0) et la fin de l'expérience (TF). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Valeurs moyennes de pH	CL	CL lec	CI	CI lec
Témoin (T0)	6,38 (b)	6,55 (a)	6,32 (b)	6,37 (b)
Témoin (TF)	6,14 (c)	6,00 (c)	6,08 (c)	6,01 (c)
<i>P. aeruginosa</i> (TF)	6,04 (c)	5,53 (f)	6,12 (c)	5,65 (e)
<i>P. fluorescens</i> (TF)	6,05 (c)	5,96 (c)	6,03 (c)	5,77 (de)
<i>R. metallidurans</i> (TF)	6,29 (b)	5,84 (d)	6,11 (c)	5,79 (de)

Le potentiel rédox augmente entre T0 et TF, notamment avec l'inoculation de *P. aeruginosa* (**tableau III.35**). La valeur la plus élevée, en moyenne, correspond à la modalité CI lec. Les autres modalités ne diffèrent pas significativement du témoin. Cette augmentation entre le début et la fin de l'expérience peut correspondre à la croissance racinaire de la plante qui aère le sol et augmente les échanges gazeux dans le sol.



**Tableau III.35** : Valeurs moyennes de Eh (mV) en fonction des différentes techniques d'inoculation entre le début (T0) et la fin de l'expérience (TF). Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Valeurs moyennes de Eh (mV)	CL	CL lec	CI	CI lec
Témoin (T0)	304,0 (bc)	246,0 (d)	303,7 (bc)	233,3 (d)
Témoin (TF)	291,0 (c)	313,7 (bc)	306,3 (bc)	328,7 (bc)
<i>P. aeruginosa</i> (TF)	344,7 (bc)	340,7 (bc)	348,3 (b)	392,0 (a)
<i>P. fluorescens</i> (TF)	318,3 (bc)	324,5 (bc)	314,3 (bc)	352,7 (b)
<i>R. metallidurans</i> (TF)	308,3 (bc)	335,0 (bc)	323,3 (bc)	346,7 (b)

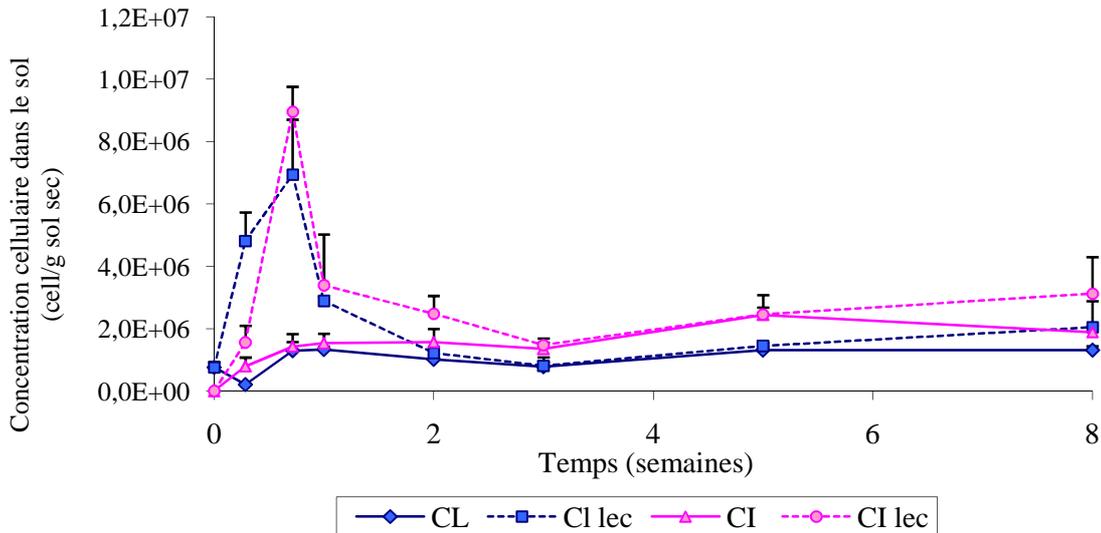
Les résultats montrent qu'après 8 semaines, le pH du sol cultivé est significativement inférieur de 0,3 unité à celui des expériences sans maïs (**tableau III.36**). Les racines ayant fortement colonisé le sol, l'exsudation d'acides organiques ou de protons par les racines peut expliquer cette baisse de pH. Le pH du sol rhizosphérique est en général plus bas de 1 à 2 unités que celui du sol non rhizosphérique (Hinsinger *et al.* 2003). En revanche le potentiel redox n'est pas significativement différent en moyenne dans un sol cultivé ou non avec du maïs.

**Tableau III.36** : Comparaison des valeurs moyennes de pH(eau) et Eh (mV), indépendamment de la technique d'inoculation, pour les expériences avec maïs et sans maïs. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Valeurs moyennes	pH (eau)	Eh (mV)
Avec maïs	5,9 (b)	330,6 (a')
Sans maïs	6,2 (a)	325,8 (a')

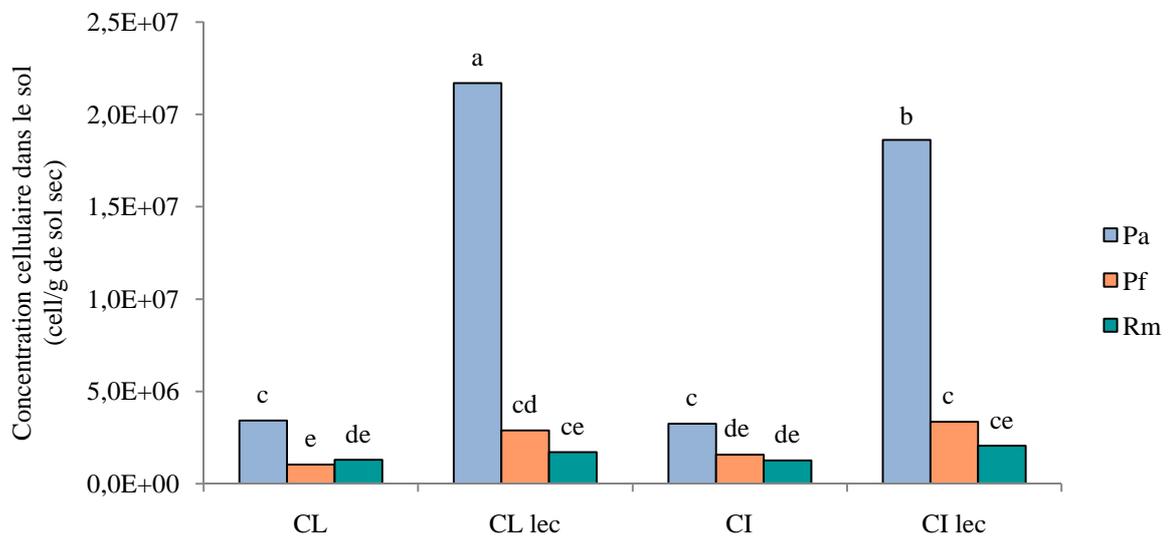
### 5.3.2. Analyses microbiologiques

La concentration maximale en microorganismes dans le sol non rhizosphérique (c'est à dire non adhérent aux racines) est atteinte après 5 et 7 j pour les trois bactéries (données non présentées). En fin d'expérience (à 8 semaines), les concentrations cellulaires microbiennes sont identiques quels que soient la technique d'inoculation et le microorganisme, excepté pour *P. fluorescens*. Dans ce dernier cas, la modalité CI lec, c'est à dire les cellules immobilisées avec lait écrémé permet d'obtenir une concentration cellulaire plus élevée (**figure 3.47**).



**Figure 3.47:** Cinétique de croissance de *P. fluorescens* inoculé dans le sol. CL : cellules libres, CL lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé. Les barres verticales représentent les écart-types.

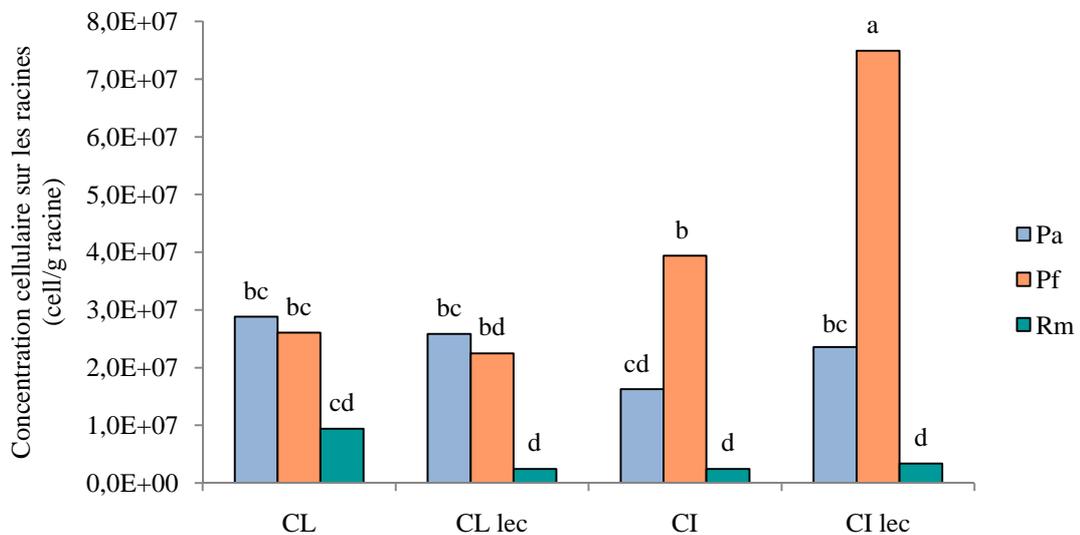
Indépendamment du facteur temps, le lait écrémé favorise la croissance de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*, en particulier avec les cellules libres de *P. aeruginosa* (**figure 3.48**). En revanche, la croissance de *R. metallidurans* ne dépend pas de la technique d'inoculation. Globalement les concentrations de *P. aeruginosa* sont supérieures à celles de *P. fluorescens* et de *R. metallidurans*.



**Figure 3.48 :** Concentration moyenne en microorganismes inoculés dans le sol en fonction des différents traitements, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

L'effet des différentes techniques d'inoculation sur les concentrations en microorganismes inoculés dans le sol ne dépend pas de la présence de la plante (**figures 3.41 et 3.48**). Par contre, en présence de maïs la concentration cellulaire de *P. aeruginosa* et *R. metallidurans* est respectivement 1,9 et 1,3 fois plus élevée, en moyenne. Bien que ces mesures aient été faites dans le sol dit non rhizosphérique, c'est à dire non adhérent aux racines, la densité élevée de racines dans les pots au bout de 8 semaines laisse à penser que les exsudats racinaires ont eu un impact sur la concentration bactérienne du sol. Les racines de maïs exsudent de nombreuses molécules, dont des sucres, principalement du glucose (51%), du sucrose (17%) et du fructose (11%), qui favorisent la croissance microbienne dans la rhizosphère (Baudoin *et al.* 2003; Krafczyk *et al.* 1984).

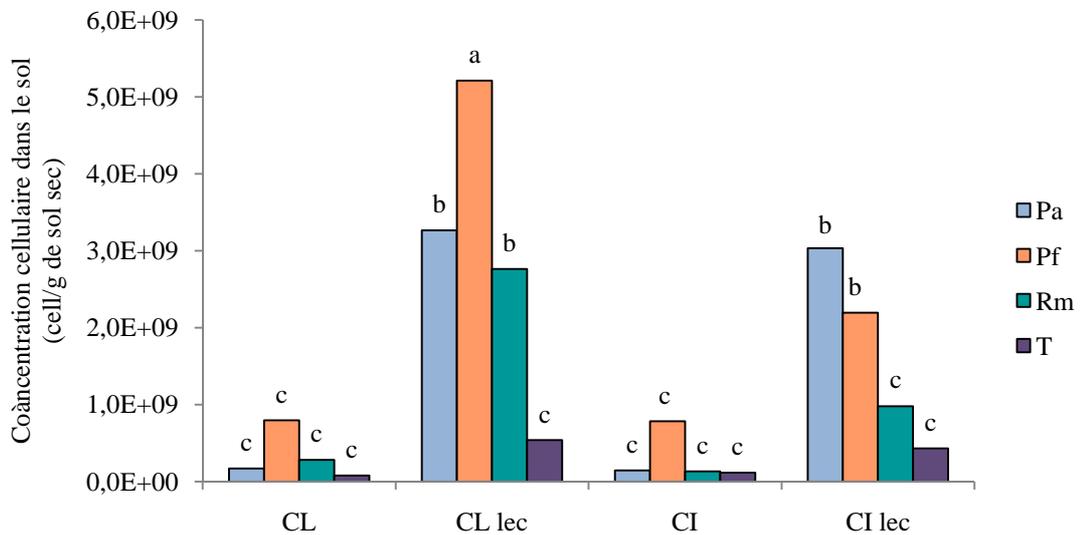
Les différentes modalités d'inoculation n'ont pas non plus, d'impact sur le nombre de microorganismes qui se sont développés sur les racines du maïs (zone rhizosphérique), excepté *P. fluorescens* avec la modalité CI lec où le nombre de microorganismes ( $7,5 \cdot 10^7$  cellules/g de racines) est significativement supérieur au témoin ( $2,6 \cdot 10^7$  cellules/g de racines) (**figure 3.49**). Comparé à *R. metallidurans*, les deux *Pseudomonas*, connus pour être rhizosphériques du maïs (Lambert *et al.* 1987), présentent des concentrations plus élevées.



**Figure 3.49** : Concentration moyenne en microorganismes inoculés dénombrés sur les racines en fonction des différents traitements, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés après ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

Les concentrations en microorganismes rhizosphériques sont en général plus élevées que celles observées dans le sol non rhizosphérique. C'est globalement le cas ici, quels que soient la technique d'inoculation et le microorganisme inoculé, notamment pour les cellules libres de *P. fluorescens* dont la concentration cellulaire sur les racines est jusqu'à 25 fois supérieure à celle mesurée dans le sol.

Le nombre de microorganismes hétérotrophes totaux des sols enrichis en lait écrémé, inoculés avec *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ou *R. metallidurans*, est supérieur à celui du témoin, excepté pour le sol inoculé avec *R. metallidurans* pour la modalité CI lec (**figure 3.50**). Aucune différence significative n'est observée entre les modalités CI lec et CL lec pour *P. aeruginosa* alors que pour *P. fluorescens* et *R. metallidurans*, la modalité CL lec stimule la croissance par rapport à CI lec.

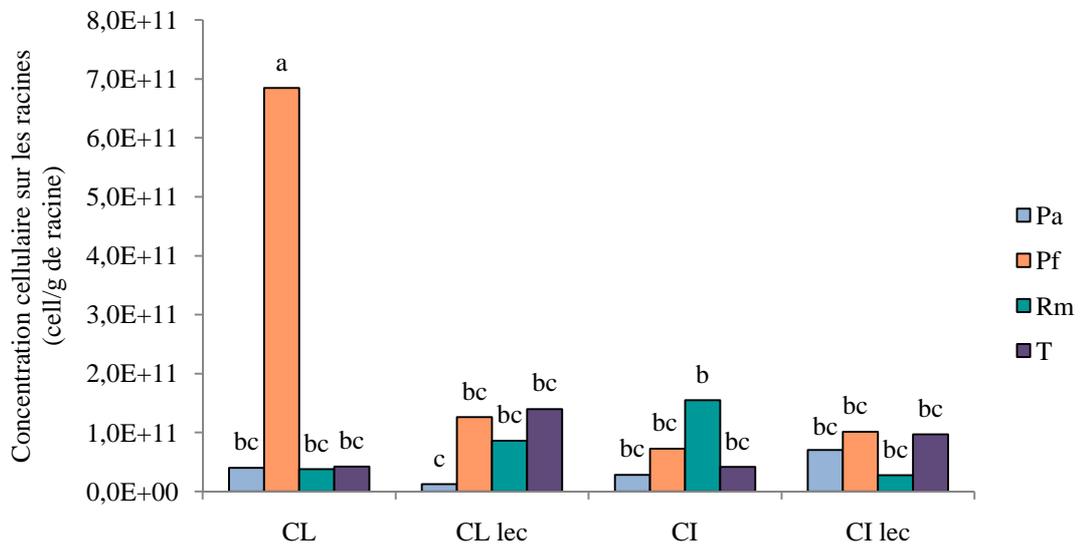


**Figure 3.50:** Concentration moyenne en microorganismes hétérotrophes totaux dans le sol en fonction de la technique d'inoculation, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (non inoculé). CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

Le nombre de microorganismes hétérotrophes totaux est globalement supérieur pour les pots sans maïs (**figure 3.42**), excepté pour les sols inoculés avec *P. fluorescens*. La concentration en microorganismes hétérotrophes totaux varie ainsi de  $7,9 \cdot 10^7$  à  $5,4 \cdot 10^8$  cellules/g de sol sec pour l'expérience avec maïs à  $3,8 \cdot 10^8$  à  $1,19 \cdot 10^9$  cellules/g de sol sec pour l'expérience sans maïs. Il est possible que la présence d'exsudats racinaires ait pu diminuer à la fois la diversité microbienne, c'est à dire le nombre de taxons présents, et le nombre total de microorganismes au profit d'espèces compétitrices (Yang et Crowley 2000). Les exsudats racinaires d'une plante

donnée peuvent en effet orienter le développement de populations bactériennes spécifiques grâce à la présence de substrats carbonés dans les exsudats ou grâce à la production de molécules signal de type homosérines lactones (Fray *et al.* 1999; Kowalchuk *et al.* 2002).

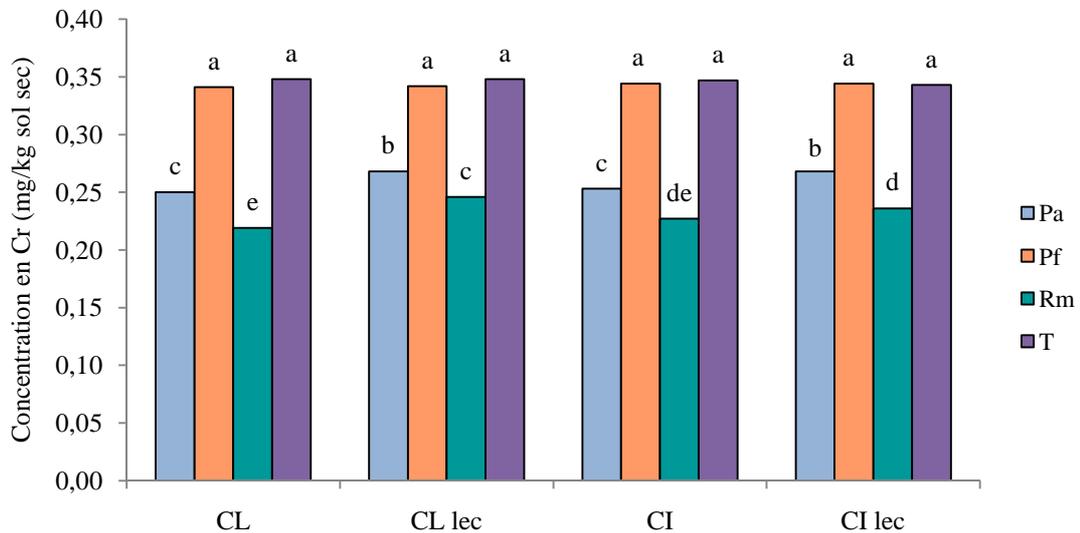
Le nombre de microorganismes totaux attachés aux racines ne varie pas significativement par rapport au témoin quels que soient la technique d'inoculation ou le microorganisme inoculé, excepté avec *P. fluorescens* pour la modalité CL, pour laquelle la concentration en microorganismes rhizosphériques atteint  $6,8 \cdot 10^{11}$  cellules/g de racine (**figure 3.51**). Le nombre de microorganismes totaux rhizosphériques étant supérieur de 4 log à celui des *P. fluorescens* dénombrées sur les racines de maïs (**figure 3.49**), cette augmentation pour la modalité CL est probablement due au développement des microorganismes indigènes, peut-être sous l'influence de l'inoculation de *P. fluorescens*.



**Figure 3.51** : Concentration en microorganismes hétérotrophes totaux fixés sur les racines selon la technique d'inoculation, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin (non inoculé). CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

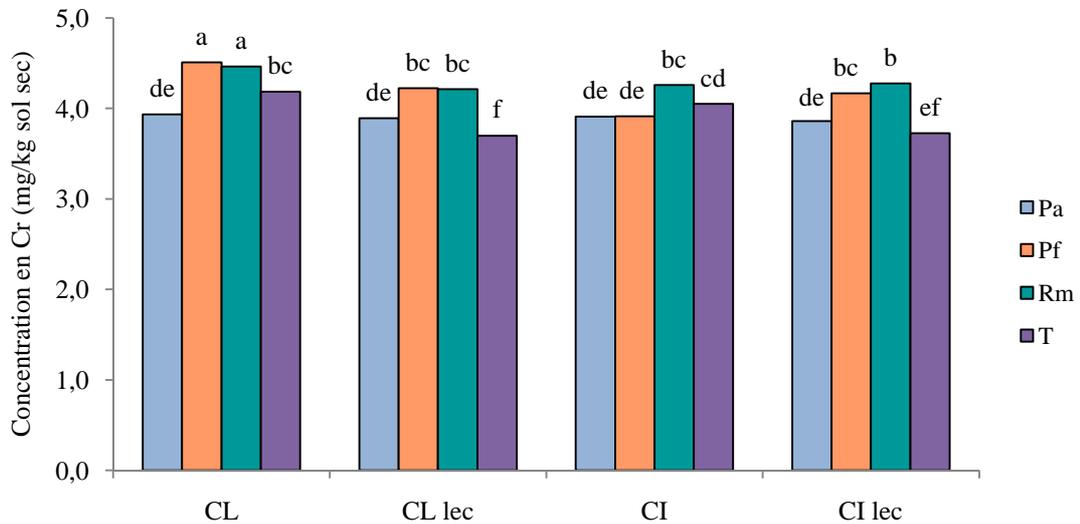
### 5.3.3. Analyse des fractions métalliques F1 et F2

Les teneurs en Cr dans la fraction F1 pour les sols inoculés avec *P. fluorescens* ou pour le témoin non inoculé, sont significativement supérieures à celles des sols inoculés avec *P. aeruginosa* et *R. metallidurans*, indépendamment du facteur temps (**figure 3.52**). Pour les sols inoculés avec *P. fluorescens* ou pour le témoin, la concentration en Cr dans la fraction F1 augmente au cours du temps, quelle que soit la technique d'inoculation, en particulier entre la 5<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine (données non présentées). Pour les sols inoculés avec *P. aeruginosa*, la concentration en Cr est maximale entre 5 et 7 jours puis diminue ensuite. Cette évolution semble liée à la croissance des cellules de *P. aeruginosa* dont la concentration maximale est également observée dans cet intervalle de temps. Les résultats montrent enfin que pour *P. aeruginosa* et *R. metallidurans*, les teneurs en Cr dans F1 sont globalement plus élevées en présence de lait écrémé, peut-être du fait de l'augmentation de la densité microbienne du sol (figure 3.50).



**Figure 3.52** : Concentration moyenne en Cr dans la fraction F1 du sol, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

L'inoculation du sol avec *P. fluorescens* et *R. metallidurans* augmente significativement la concentration en Cr dans la fraction F2 par rapport au témoin, excepté pour la modalité CI (**figure 3.53**). Pour *P. aeruginosa*, aucune différence significative n'est observée selon la technique d'inoculation. La présence de lait écrémé contribue à la diminution des teneurs en Cr dans la fraction F2 mais uniquement pour le témoin. Pour *P. aeruginosa*, la concentration maximale en Cr F2 est atteinte au bout de 2 j, quelle que soit la technique d'inoculation, avec 5,1 mg Cr/kg de sol, concentration qui diminue progressivement ensuite pour atteindre 2,9 mg Cr/kg de sol en moyenne en fin d'expérience (données non présentées). La même tendance est observée pour *R. metallidurans*. A l'inverse, la concentration en Cr dans la fraction F2 augmente globalement entre T0 et TF pour le témoin et les cellules immobilisées de *P. fluorescens*, avec un pic à 2 semaines et à 5 semaines pour les cellules libres.

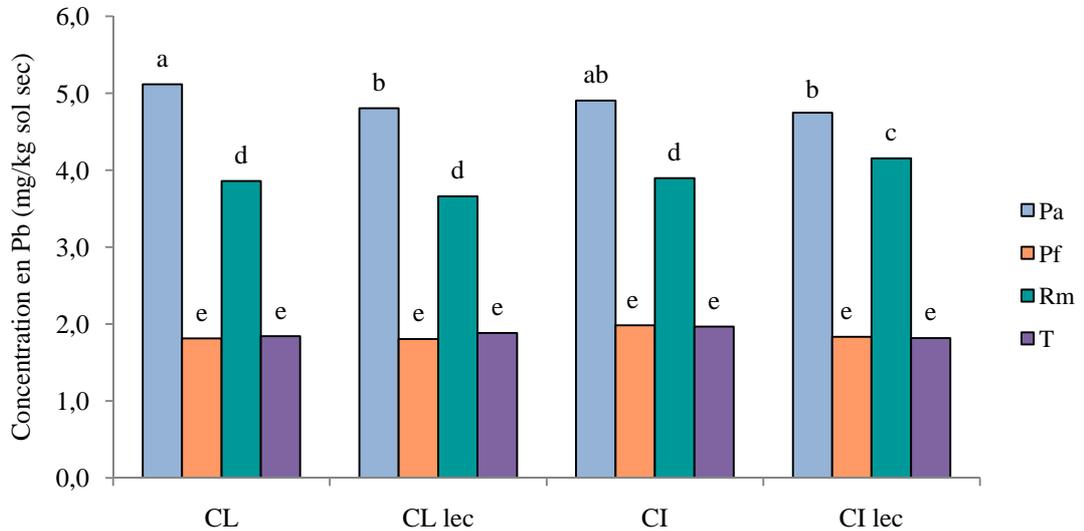


**Figure 3.53** : Concentration en Cr dans la fraction F2 du sol, selon la technique d'inoculation, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

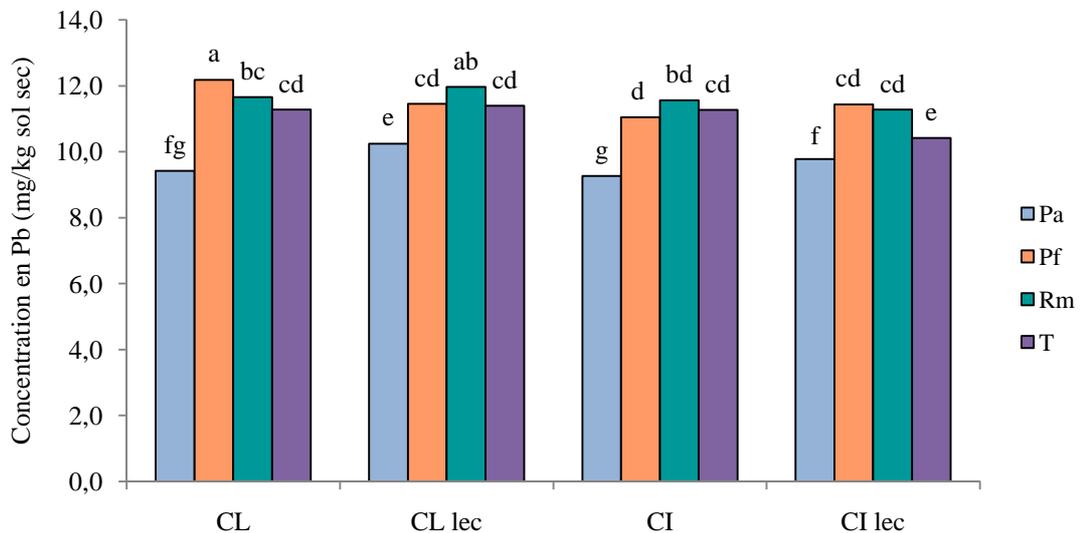
L'inoculation du sol avec *P. aeruginosa* et *R. metallidurans*, quelle que soit la technique d'inoculation, augmente significativement la concentration en Pb dans la fraction F1 par rapport au témoin, tandis que l'inoculation de *P. fluorescens* n'a pas d'impact significatif sur les teneurs en Pb dans F1 (**figure 3.54**). Aucune différence significative n'est observée pour *P. fluorescens* ou le témoin selon la technique d'inoculation. Enfin, les modalités les plus efficaces sont CI lec pour *R. metallidurans* et CL pour *P. aeruginosa*.

Les teneurs en Pb dans la fraction F2 du sol sont significativement supérieures au témoin pour les sols inoculés avec *R. metallidurans* et enrichis en lait écrémé et avec *P. fluorescens* pour

les modalités CL et CI lec (**figure 3.55**). En revanche les teneurs en Pb dans la fraction F2 des sols inoculés avec *P. aeruginosa* sont significativement inférieures au témoin quelle que soit la modalité. Pour les sols inoculés avec *P. aeruginosa*, la présence de lait écrémé augmente significativement les teneurs en Pb dans la fraction F2 par rapport aux sols sans lait écrémé.



**Figure 3.54** : Concentration en Pb dans la fraction F1 du sol, selon la technique d'inoculation, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.



**Figure 3.55** : Concentration en Pb dans la fraction F2 du sol, selon la technique d'inoculation, indépendamment du facteur temps. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés après ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.



L'inoculation de *P. fluorescens* semble être relativement peu efficace sur la mobilité des métaux dans la fraction F1 étant donné le peu d'écart observé avec les pots témoin. Les études précédentes ont montré que *P. fluorescens* produit quantitativement moins de sidérophores que *P. aeruginosa* (voir paragraphe 3) et est moins résistante au mélange de métaux que ne peut l'être *R. metallidurans* (voir tableau III.8).

Indépendamment de la technique d'inoculation, la présence de maïs augmente significativement les teneurs en Cr dans les fractions F1 et F2 ainsi que celles du Pb dans la fraction F1 par rapport à l'expérience sans maïs (**tableau III.37**). L'effet inverse est observé pour le Pb dans la fraction F2. Cette augmentation reflète sans doute la diminution du pH due à la présence de maïs (**tableau III.36**). Un pH faible contribue en effet à augmenter la mobilité des métaux en diminuant le nombre de sites d'adsorption disponibles pour les métaux dans le sol (Arnfolk *et al.* 1996). Par conséquent une diminution de pH permet d'augmenter les teneurs dans les fractions bioaccessibles où les métaux sont soit échangeables (F1) soit liés aux carbonates (F2). La présence de maïs joue non seulement sur le pH en le diminuant mais aussi sur la mobilité des métaux dans le sol grâce également aux exsudats contenant des acides organiques capables de complexer les métaux (citrique, malique, oxalique) (Marschener 1998; Mench *et al.* 1987)

Cette augmentation peut aussi refléter la stimulation par les exsudats racinaires du maïs de la production de métabolites bactériens (Latour *et al.* 1996). Le maïs exsude notamment du fructose et du glucose, substrats qui stimulent la production de sidérophores par *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* (voir chapitre 2).

**Tableau III.37** : Comparaison des teneurs moyennes en Cr et Pb dans les fractions F1 et F2 (mg/kg de sol sec) pour les expériences avec et sans maïs. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Teneurs en mg/kg de sol sec	Avec maïs	Sans maïs
Cr F1	0,29 (g)	0,15 (h)
Cr F2	4,07 (c)	3,85 (d)
Pb F1	3,13 (e)	0,96 (f)
Pb F2	10,96 (b)	12,84 (a)

### 5.3.4. Production de biomasse végétale

La biomasse foliaire produite par le maïs pour les pots inoculés n'augmente pas significativement par rapport au témoin, excepté pour *P. aeruginosa* pour la modalité CI lec (**tableau III.38**). Indépendamment du microorganisme inoculé, la biomasse foliaire des modalités avec lait écrémé augmente en moyenne de 2,5 g et 2,3 g respectivement pour les modalités CI lec et CL lec comparé à 1,4 g en moyenne pour les modalités sans lait écrémé. Le lait écrémé peut constituer une source directe de nutriments pour la plante. En revanche, l'effet PGPR\* constaté avec *P. fluorescens* pour l'expérience *in vitro* n'est pas visible ici, soit en raison de la compétition avec les autres microorganismes ou parce que les métabolites responsables de cet effet PGPR ne sont pas produits en quantité suffisante ou sont dégradés par les microorganismes indigènes. Pour la biomasse racinaire, il n'y a pas de différences significatives quels que soient l'inoculum ou la modalité, excepté pour les pots inoculés avec *R. metallidurans* pour la modalité CI lec, pour laquelle la biomasse produite est 2,9 fois inférieure au témoin. Cette diminution peut s'expliquer soit par un effet inhibiteur de l'inoculation de *R. metallidurans* sur la croissance des racines ou par une augmentation de la teneur en métaux dans les racines pour cette modalité, ce qui provoquerait un effet toxique et diminuerait la biomasse.

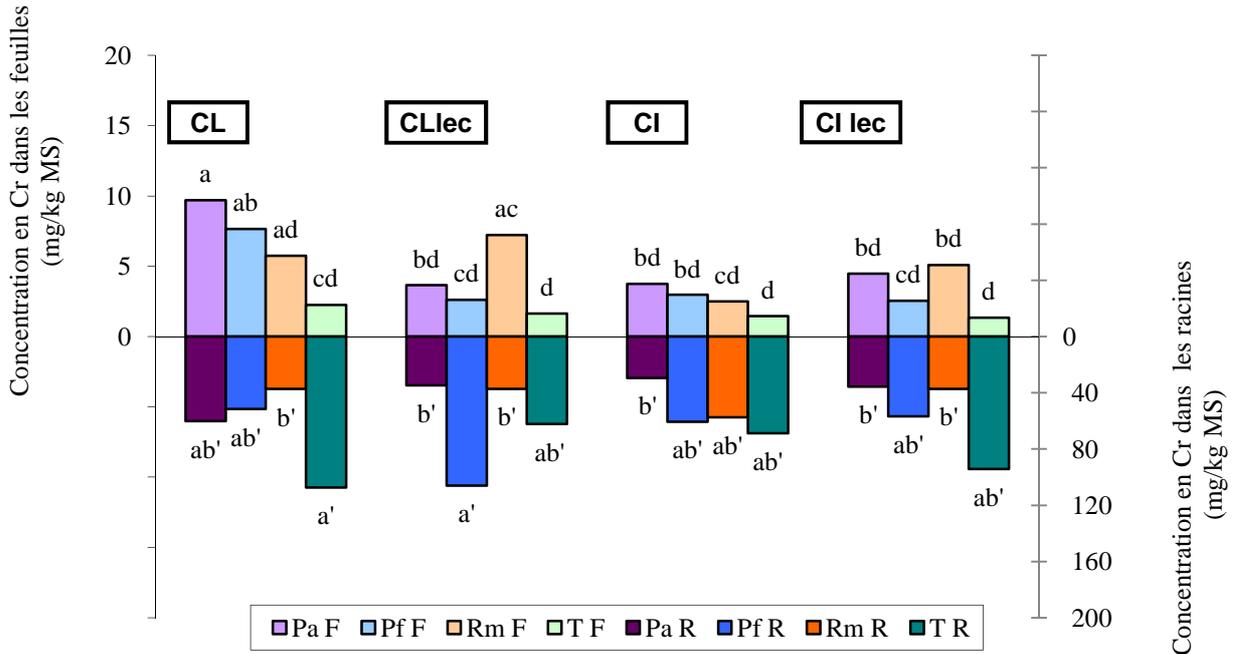
**Tableau III.38** : Valeurs moyennes de la biomasse (en g) produite en fonction des différentes techniques d'inoculation. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Biomasse (g)		CL	CL lec	CI	CI lec
Feuilles	Témoin	1,63 (bc)	2,18 (bc)	1,44 (bc)	2,73 (b)
	<i>P. aeruginosa</i>	1,23 (bc)	2,64 (b)	1,57 (bc)	4,51 (a)
	<i>P. fluorescens</i>	1,46 (bc)	1,88 (bc)	1,52 (bc)	1,97 (bc)
	<i>R. metallidurans</i>	1,39 (bc)	2,75 (b)	1,27 (bc)	0,94 (c)
Racines	Témoin	0,74 (a'b')	0,42 (a'b')	0,48 (a'b')	0,93 (a')
	<i>P. aeruginosa</i>	0,35 (b')	0,48 (a'b')	0,46 (a'b')	0,82 (a'b')
	<i>P. fluorescens</i>	0,45 (a'b')	0,80 (a'b')	0,47 (a'b')	0,52 (a'b')
	<i>R. metallidurans</i>	0,30 (b')	0,61 (a'b')	0,43 (a'b')	0,28 (b')

\* Voir glossaire

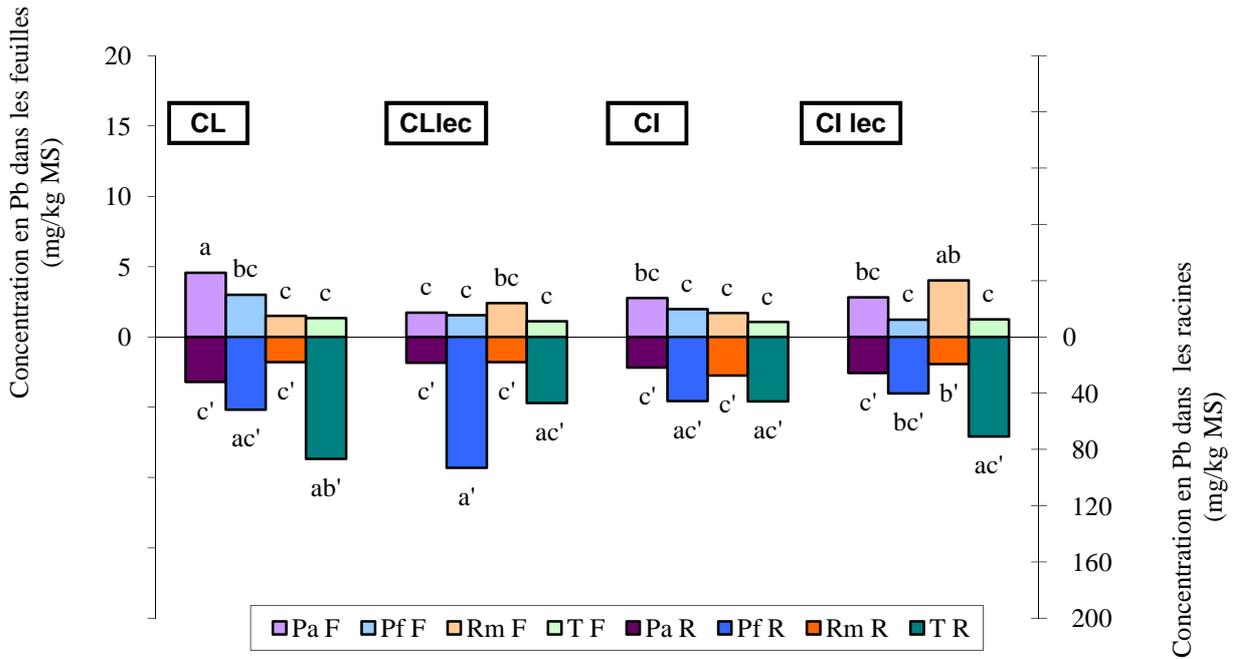
### 5.3.5. Teneurs en métaux dans les feuilles et racines.

L'inoculation des pots avec des cellules libres (CL) de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et des cellules libres de *R. metallidurans* avec du lait écrémé (CL lec) augmente significativement la concentration en Cr dans les feuilles de maïs, respectivement de 4,3 ; 3,4 ; et 4,5 fois par rapport à leurs témoins respectifs (**figure 3.56**). En revanche, seule l'inoculation avec *P. fluorescens* (modalité CL lec) permet d'augmenter la concentration en Cr dans les racines par rapport au témoin, mais pas de façon significative.



**Figure 3.56** : Concentration en Cr dans les feuilles (F) et racines (R) du maïs, en fonction de la technique d'inoculation. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

Pour le plomb, l'inoculation des pots avec *P. aeruginosa* CL permet comme pour le Cr, d'augmenter les concentrations en métaux dans les feuilles d'un facteur 3,4 par rapport au témoin CL (**figure 3.57**). L'inoculation de *R. metallidurans* (modalité CI lec) permet également d'augmenter les teneurs en Pb dans les feuilles de 3,2 fois par rapport au témoin. Le prélèvement de Cr et de Pb dans les feuilles de maïs semble par ailleurs être corrélé pour les deux modalités CL et CI lec. L'inoculation de cellules libres de *P. aeruginosa* et *R. metallidurans* diminue significativement les teneurs en Pb dans les racines par rapport au témoin, les bactéries auraient alors un rôle protecteur vis à vis du Pb pour les racines de maïs, ou améliorerait le facteur de translocation.



**Figure 3.57** : Concentration en Pb dans les feuilles (F) et racines (R) du maïs, en fonction de la technique d'inoculation. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI Lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

Les concentrations en Hg dans les feuilles de maïs sont nulles ou inférieures au seuil de détection. Les concentrations dans les racines ne sont pas significativement différentes quels que soient l'inoculum ou la modalité d'inoculation (données non présentées). Ces valeurs varient de 1,2 à 2 mg de Hg/kg de MS.

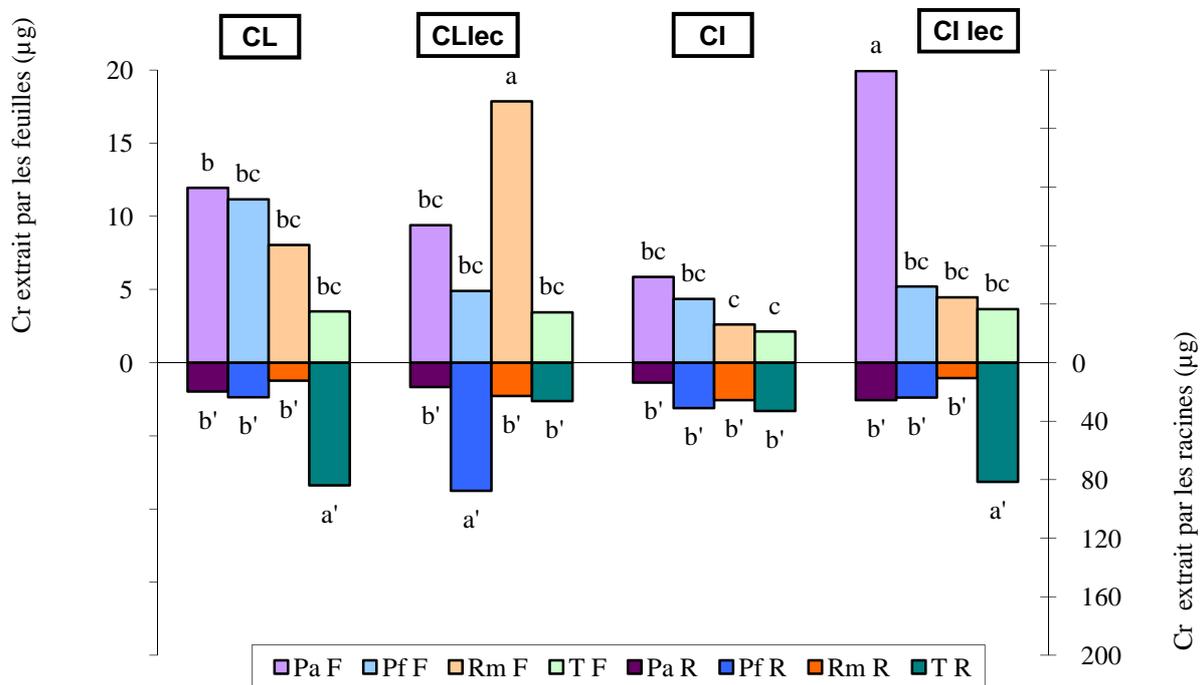
Le **tableau III.39** présente les teneurs en métaux du maïs prélevé au champ à deux stades végétatifs comparativement aux teneurs de l'expérience en pot, en conditions contrôlées. Ce tableau montre que les résultats des expériences en pots sont différents de ceux enregistrés sur le terrain, en particulier pour le Pb dans les feuilles et le Pb et le Cr dans les racines. Le prétraitement du sol par tamisage et triage ainsi qu'un taux d'humidité, un éclairage et une température constants expliquent très certainement ces différences.

**Tableau III.39** : Concentrations moyennes en Cr et Pb ( $\pm$ écart-type) dans le maïs prélevé sur la parcelle d'étude (sol B) le 18/06/04 pour le stade 6-8 feuilles et le 30/09/04 au stade récolte et dans le maïs au stade 6-8 feuilles cultivé en pots en conditions contrôlées pour la modalité témoin (mg de métal/kg de MS).

Métaux	Concentration dans les feuilles (mg/kg MS)			Concentration dans les racines (mg/kg MS)		
	Cr	Hg	Pb	Cr	Hg	Pb
Maïs stade 6-8 feuilles	1,82 ( $\pm$ 0,73)	<ld	6,31 ( $\pm$ 1,51)	45,54 ( $\pm$ 14,52)	0,74 ( $\pm$ 0,20)	28,43 ( $\pm$ 3,72)
Maïs stade récolte	0,44 ( $\pm$ 0,06)	<ld	5,49 ( $\pm$ 1,25)	31,62 ( $\pm$ 5,99)	0,32 ( $\pm$ 0,29)	20,00 ( $\pm$ 2,82)
Expérience en pot stade 6-8 feuilles	2,24 ( $\pm$ 1,41)	<ld	1,34 ( $\pm$ 0,53)	107,35 ( $\pm$ 45,63)	1,03 ( $\pm$ 0,72)	86,86 ( $\pm$ 36,86)

<ld : inférieur à la limite de détection

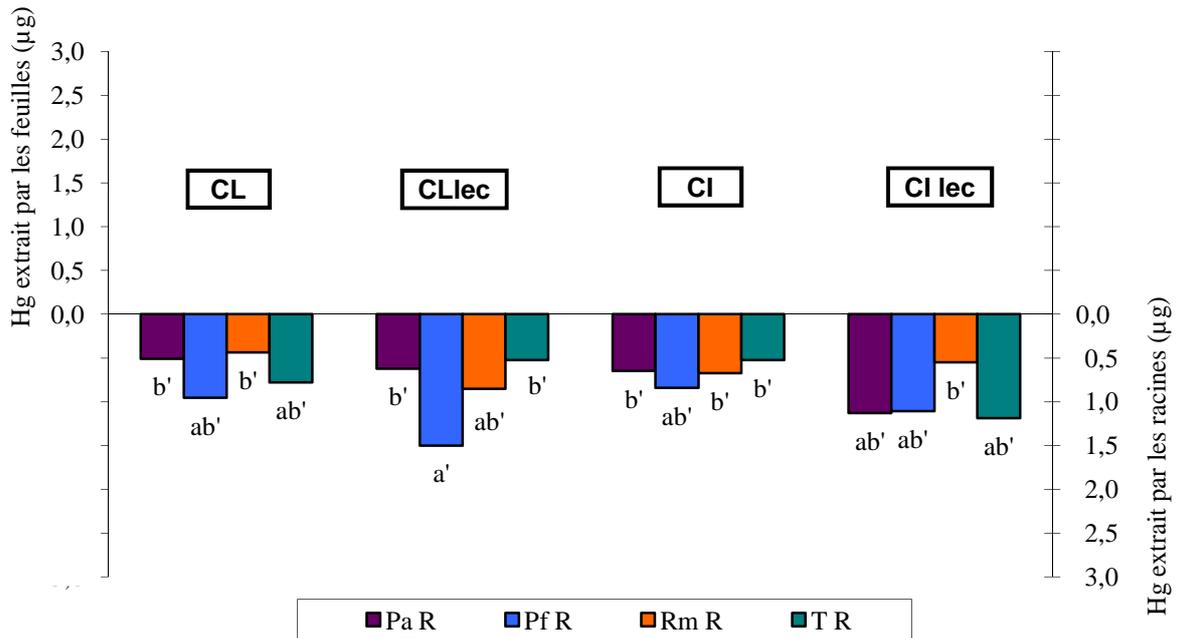
Les plantes cultivées sur les sols inoculés avec *R. metallidurans* (modalité CL lec) et avec *P. aeruginosa* (modalité CI lec) extraient respectivement 5,2 et 5,4 fois plus de Cr dans leurs feuilles que leurs témoins (**figure 3.58**). Toutes les autres modalités ne montrent aucune différence par rapport au témoin.



**Figure 3.58** : Cr extrait par les feuilles (F) et racines (R) du maïs en fonction de la technique d'inoculation. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

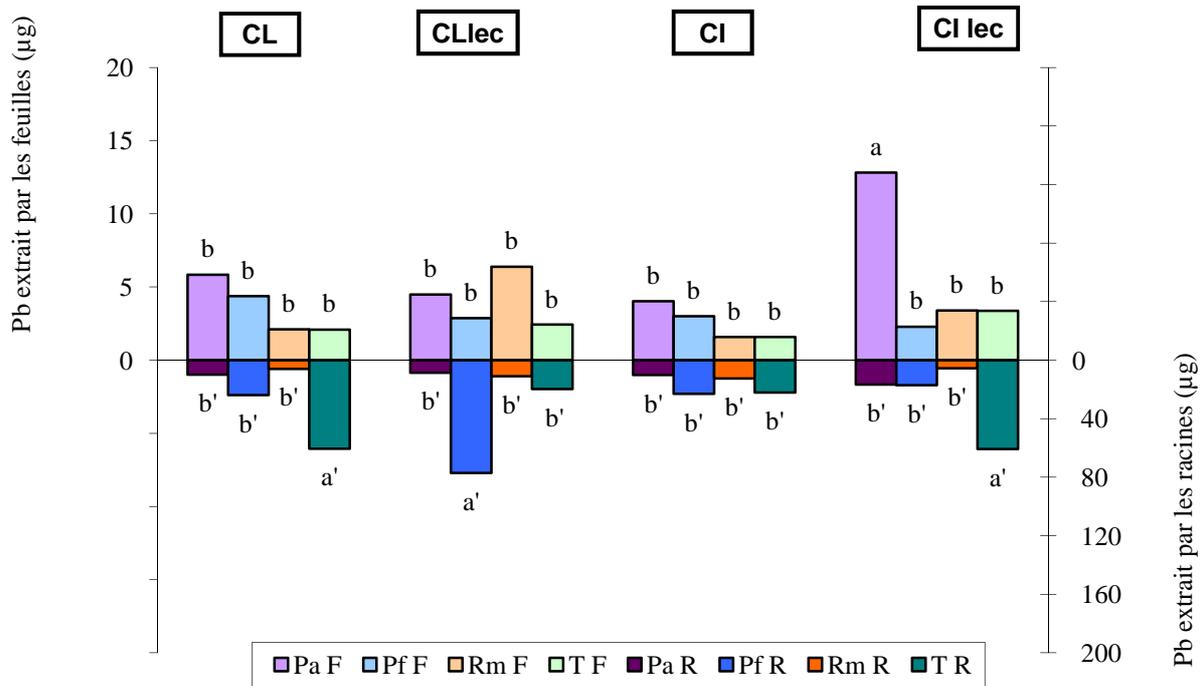
Les quantités extraites par les racines de maïs, pour les sols bioaugmentés, sont inférieures ou peu différentes du témoin, quel que soit le microorganisme, excepté pour *P. fluorescens* pour la modalité CL lec, où la quantité extraite par les racines est 3,3 fois supérieure à celle du témoin.

Les teneurs en mercure accumulées dans les feuilles de maïs sont nulles ou inférieures au seuil de détection. Seule la quantité de Hg extraite par les racines pour la modalité CL lec du sol inoculé avec *P. fluorescens* est supérieure au témoin (**figure 3.59**). Cette augmentation peut être liée à l'augmentation de la biomasse racinaire pour cette modalité (tableau II.38) et à l'augmentation de la concentration en Hg pour les pots inoculés avec *P. fluorescens*.



**Figure 3.59** : Hg extrait par les feuilles (F) et racines (R) du maïs, en fonction de la technique d'inoculation. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

Les quantités de Pb extraites par les feuilles et les racines de maïs sont en moyenne 1,9 fois plus faibles que celles de Cr (**figure 3.60**), ce qui contredit les résultats obtenus avec le substrat sable/perlite stérile où l'extraction du Pb par les feuilles était 16 fois supérieure à celle du Cr (paragraphe 4.2). Il faut cependant noter que dans cette expérience sur sable/perlite, le PbII, sous forme  $Pb(NO_3)_2$  était plus mobile que le CrIII sous forme  $CrCl_3$ . Les modalités les plus efficaces pour l'extraction de Pb sont les mêmes que pour le Cr, c'est à dire *P. aeruginosa* (modalité CI lec) pour l'extraction par les feuilles et *P. fluorescens* (modalité CL lec) pour les racines avec une augmentation respective des teneurs en Pb de 3,8 et 3,9 par rapport aux témoins.



**Figure 3.60** : Pb extrait par les feuilles (F) et racines (R) du maïs, en fonction de la technique d'inoculation. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA. Pa : *P. aeruginosa*, Pf : *P. fluorescens*, Rm : *R. metallidurans*, T : témoin. CL : cellules libres, CL Lec : cellules libres + lait écrémé, CI : cellules immobilisées, CI lec : cellules immobilisées + lait écrémé.

En conclusion la modalité la plus efficace pour augmenter à la fois la quantité de Cr et de Pb extrait par les feuilles de maïs est donc l'inoculation du sol avec des cellules immobilisées de *P. aeruginosa* dans des billes d'alginate de calcium avec du lait écrémé. Les études *in vitro* d'optimisation de la production de sidérophores (paragraphe 4) ont en effet montré que cette formulation pouvait favoriser l'activité des sidérophores produits par *P. aeruginosa* dans un milieu contenant du Fe et des métaux par rapport à une inoculation de cellules libres (**figure 3.31**).

Cependant, les faibles quantités de métal extrait ne permettent pas de diminuer significativement les teneurs en métaux du sol (**tableau III.40**). Ces résultats démontrent également qu'il n'y a pas de perte par volatilisation pour le mercure ou par lixiviation lors de l'expérience. La modalité qui permet d'extraire le plus de métaux par la plante entière (feuilles et racines) est la modalité avec *P. fluorescens*, inoculée sous forme de cellules libres avec du lait écrémé (Pf CL lec), qui permet d'extraire 92 µg de Cr, 1,5 µg de Hg et 80 µg de Pb par plante. Rapporté au poids de terre de chaque pot, c'est à dire 1,5 kg, la diminution de métal devrait être en théorie de 61 µg/kg sol pour le Cr, 1 µg/kg de sol pour Hg et 53µg/kg de sol pour Cr. Cette extraction n'est pas suffisante pour observer des différences significatives au niveau de la concentration en métaux totaux en fin d'expérience.

**Tableau III.40:** Comparaison des teneurs en métaux totaux dans le sol au début (T0) et à la fin de l'expérience (TF). Les lettres représentent les groupes homogènes d'après l'ANOVA.

Concentration en métaux (mg/kg de sol)	Cr	Hg	Pb
T T0	477,5 (a)	11,3 (a')	380,1 (a'')
T TF	472,6 (a)	11,8 (a')	392,2 (a'')
Pa TF	469,2 (a)	11,1 (a')	372,4 (a'')
Pf TF	483,0 (a)	11,9 (a')	385,1 (a'')
Rm TF	480,5 (a)	11,3 (a')	382,5 (a'')

Le facteur de translocation (FT) du Cr et du Pb est significativement supérieur pour les sols inoculés avec *P. aeruginosa* ou *R. metallidurans* par rapport au témoin, quelle que soit la technique d'inoculation (**tableau III.41**). En revanche, les résultats obtenus pour *P. fluorescens* ne sont pas différents du témoin. Cette augmentation du facteur de translocation due à l'inoculation de *P. aeruginosa* ou *R. metallidurans* peut refléter la production de métabolites qui a pu faciliter le transport des métaux des racines vers les feuilles. Le transport du Pb ou du Cr est en effet amélioré lorsque ces métaux sont complexés à un ligand car, dans ce cas, les métaux ne sont plus retenus par les parois des cellules végétales comme c'est le cas pour les ions métalliques PbII et CrIII (Han *et al.* 2004; Srivastava *et al.* 1999).

**Tableau III.41 :** Facteur de translocation moyen (FT) du Cr et du Pb, indépendamment de la technique d'inoculation. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Facteur de translocation	FT Cr	FT Pb
Témoin	0,023 (b)	0,020 (b')
<i>P. aeruginosa</i>	0,148 (a)	0,138 (a')
<i>P. fluorescens</i>	0,075 (ab)	0,045 (b')
<i>R. metallidurans</i>	0,141 (a)	0,129 (a')
Témoin sur sable/perlite	0,051	0,159
Maïs prélevé en champ, stade 6-8 feuilles	0,040	0,222
Maïs cultivé sur sol contaminé par 2500 mg/kg de Pb) (Huang et Cunningham 1996)	-	0,180
Maïs cultivé sur un sol contaminé par 100 mg/kg CrIII (Shahandeh et Hossner 2000)	0,023	-



Par comparaison aux résultats obtenus avec le substrat sable/perlite stérile, le FT du Cr et du Pb pour les sols inoculés avec *P. aeruginosa* a augmenté ainsi que le FT du Cr pour *P. fluorescens* (**tableau III.27**). Inversement, pour *R. metallidurans* et le témoin, le FT est jusqu'à 8 fois inférieur pour le Pb par rapport aux expériences sur sable/perlite. Par comparaison avec le maïs au stade 6-8 feuilles prélevé en champ, et les valeurs relevées dans la littérature, le facteur de translocation pour le Cr pour le témoin est quasi identique. Pour le Pb, les valeurs de la littérature et des expériences sur sable/perlite ou en champ sont très supérieures aux valeurs obtenues en pots. Le maïs en champ accumulant moins de Pb dans ses racines mais plus dans ses feuilles par rapport aux expériences en pots, cela explique le FT plus élevé.

L'inoculation du sol avec *P. aeruginosa* augmente significativement le facteur de bioaccumulation (FB) du Pb dans les feuilles, par rapport au témoin, (**tableau III.42**). L'inoculation du sol avec les trois microorganismes étudiés permet également d'augmenter significativement le FB du Cr par rapport au témoin. Ce facteur est en moyenne 134 fois inférieur pour le Cr à celui obtenu sur sable/perlite stérile et 691 fois inférieur pour le Pb (tableau III.28). La culture sur sable a effectivement tendance à favoriser l'exsudation racinaire (Mishra *et al.* 1995), qui cumulé à une plus grande disponibilité des métaux peut expliquer les différences entre cultures sur sable et en pots de terre pour les facteurs de translocation et de bioaccumulation.

**Tableau III.42** : Facteurs de bioaccumulation moyen (FB) du Cr et du Pb dans les feuilles, indépendamment de la technique d'inoculation. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés d'après l'ANOVA.

Facteur de bioaccumulation	FB Cr	FB Pb
Témoin	0,003 (b)	0,003 (b')
<i>P. aeruginosa</i>	0,011 (a)	0,008 (a')
<i>P. fluorescens</i>	0,008 (a)	0,005 (ab')
<i>R. metallidurans</i>	0,009 (a)	0,006 (ab')
Témoin sur sable/perlite	0,522	2,939
Maïs prélevé en champ, stade 6-8 feuilles	0,004	0,017
Maïs cultivé sur sol contaminé par 2500 mg/kg de Pb (Huang et Cunningham 1996)	-	0,090
Maïs cultivé sur un sol contaminé par 100 mg/kg CrIII (Shahandeh et Hossner 2000)	0,031	-

En ce qui concerne les prélèvements en champ, les valeurs de FB pour les feuilles sont comparables aux études en pots. Les valeurs issues de la littérature sont largement supérieures aux expériences réalisées en pots, du fait de la faible disponibilité en Cr et en Pb et de l'âge de la contamination.

L'augmentation des teneurs en métaux dans le maïs inoculé est peut-être liée à l'action directe des métabolites bactériens, dont les sidérophores, sur le prélèvement de ces métaux. En effet, plusieurs études ont montré que les sidérophores bactériens pouvaient servir de réserve en Fe pour la plante (Bar-Ness *et al.* 1992; Crowley *et al.* 1992; Wang *et al.* 1993). Les sidérophores, capables de mobiliser des métaux autres que le Fe dans le sol ont pu favoriser le prélèvement de Cr et de Pb par la plante (Diels *et al.* 1999).

L'exsudation racinaire des végétaux peut dans certains cas être influencée par la présence de microorganismes dans la rhizosphère (Groleau-Renaud *et al.* 2000; Klein *et al.* 1988). Une hypothèse est que les microorganismes du sol peuvent augmenter l'exsudation racinaire et qu'en retour, les exsudats racinaires affectaient significativement le prélèvement des métaux, notamment les exsudats racinaires de maïs (Mench et Martin 1991; Mench *et al.* 1987). De plus, les acides organiques, présents dans ces exsudats, connus pour être de bons complexants des métaux, peuvent augmenter le prélèvement et le facteur de translocation du CrIII par les plantes (Srivastava *et al.* 1999). Des sidérophores sécrétés par la plante (phytosidérophores) peuvent également avoir un rôle, bien que dans certains cas les sidérophores bactériens soient en général plus efficaces et plus facilement absorbés par la plante que les phytosidérophores (Crowley *et al.* 1992). Les phytosidérophores peuvent néanmoins solubiliser des métaux, tels que le Fe, dans la rhizosphère (Marschner *et al.* 1987) mais également le Cd, Ni et Zn (Awad et Romheld 2000; Shenker *et al.* 2001; Zhang *et al.* 1991).

En résumé, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'augmentation du prélèvement des métaux et du facteur de translocation par la plante grâce à la bioaugmentation des microorganismes :

- L'action directe des microorganismes, qui par l'intermédiaire de leurs métabolites (sidérophores), favorisent la mobilisation des métaux et donc le prélèvement par les racines ;
- La stimulation d'autres populations microbiennes, par l'action de sidérophores ou d'autres molécules signal, qui à leur tour produisent des métabolites impliqués dans la mobilisation des métaux et leur prélèvement par les plantes ;
- La stimulation de l'exsudation racinaire, en particulier de composés chélatants (phytosidérophores ou acides organiques) de manière directe ou indirecte suite à la stimulation de populations microbiennes indigènes.

Le manque d'informations sur l'effet des sidérophores bactériens sur les plantes ne nous permet pas actuellement d'avaliser l'une ou l'autre de ces hypothèses. Une combinaison de plusieurs de ces hypothèses est à envisager, étant donné la complexité des interactions régissant le fonctionnement de la rhizosphère.

### 5.3.6. Analyse globale des facteurs régissant la phytoextraction des métaux

La matrice de corrélation réalisée pour tous les paramètres étudiés est présentée en annexe 3. Les tableaux présentés ci-dessous sont tirés de cette matrice de corrélation. Les coefficients de corrélation du pH et du Eh sont présentés dans le **tableau III.43**. La concentration en microorganismes inoculés (MI) dans le sol est corrélée négativement au pH ( $r^2=-0,737$ ) et positivement à Eh ( $r^2=0,532$ ). La fraction bioaccessible du Cr (F1 + F2) est corrélée positivement au pH ( $r^2=0,292$ ) et négativement à Eh ( $r^2=-0,287$ ), ce qui correspond aux observations de Chuan *et al.* (1996) qui ont démontré que lorsque le potentiel rédox diminuait, la mobilité de Cr et de Pb augmentait. Cette observation est confirmée avec Pb F2 ( $r^2=-0,460$ ) mais pas pour Pb F1 ( $r^2=0,485$ ). Bien que le pH puisse influencer le prélèvement de Pb par la plante, aucune corrélation significative n'est observée pour cette étude entre les teneurs en métaux dans la plante et le pH du sol (**annexe 3**).

Les teneurs en Cr F1 du sol sont corrélées négativement à la concentration en Cr ( $r^2=-0,413$ ) dans les feuilles mais positivement à celles des racines ( $r^2=0,501$ ) (**tableau III.44**). A l'opposé la concentration en Pb dans F1 est corrélée positivement à la concentration en Pb dans les feuilles ( $r^2=0,424$ ) et négativement à la concentration dans les racines ( $r^2=-0,621$ ). La méthode de Tessier utilisée pour l'extraction séquentielle des métaux est par conséquent adaptée à l'estimation de la quantité de Pb prélevé par les feuilles de maïs et à celle du Cr prélevé par les racines. Les teneurs en métaux dans la fraction bioaccessible, c'est à dire F1 + F2, est plutôt influencée par la fraction F2 pour le Cr ( $r^2=0,979$ ) et par F1 pour le Pb ( $r^2=0,752$ ).

**Tableau III.43:** Coefficients de corrélation de Pearson regroupant le pH et Eh du sol et les différents paramètres biologiques et chimiques analysés. Les valeurs en gras sont significatives au seuil ;  $\alpha=0,05$ . **MI** : microorganismes inoculés, **MHT** : microorganismes hétérotrophes totaux, **sol** : microorganismes dans le sol non rhizosphérique, **rhizo** : microorganismes dans le sol rhizosphérique.

	pH	Eh
pH	1	<b>-0,583</b>
Eh	<b>-0,583</b>	1
MI sol	<b>-0,737</b>	<b>0,532</b>
MI rhizo	<b>-0,341</b>	<b>0,299</b>
MHT sol	<b>-0,617</b>	<b>0,331</b>
MHT rhizo	0,103	-0,135
Cr (F1+F2)	<b>0,292</b>	<b>-0,287</b>
Pb (F1+F2)	-0,199	0,224
CrF1	0,059	<b>-0,326</b>
CrF2	0,271	-0,212
PbF1	-0,263	<b>0,485</b>
PbF2	0,154	<b>-0,460</b>

**Tableau III.44 :** Coefficients de corrélation de Pearson regroupant les teneurs en métaux dans les végétaux et dans les fractions F1 et F2 du sol. Les valeurs en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$ .

	Pb (mg/kg feuilles)	Cr (mg/kg feuilles)	Pb (mg/kg racine)	Cr (mg/kg racine)	Cr (F1+F2)	Pb (F1+F2)	CrF1	CrF2	PbF1	PbF2
Pb (mg/kg feuilles)	1									
Cr (mg/kg feuilles)	<b>0,689</b>	1								
Pb (mg/kg racine)	-0,154	<b>-0,316</b>	1							
Cr (mg/kg racine)	-0,140	<b>-0,351</b>	<b>0,769</b>	1						
Cr (F1+F2)	0,037	0,242	0,083	0,062	1					
Pb (F1+F2)	<b>0,325</b>	<b>0,487</b>	<b>-0,617</b>	<b>-0,530</b>	0,284	1				
CrF1	<b>-0,344</b>	<b>-0,413</b>	<b>0,620</b>	<b>0,501</b>	-0,052	<b>-0,865</b>	1			
CrF2	0,106	<b>0,318</b>	-0,045	-0,041	<b>0,979</b>	<b>0,451</b>	-0,254	1		
PbF1	<b>0,424</b>	<b>0,414</b>	<b>-0,621</b>	<b>-0,540</b>	-0,221	<b>0,752</b>	<b>-0,870</b>	-0,037	1	
PbF2	-0,243	-0,028	0,181	0,166	<b>0,682</b>	0,089	0,254	<b>0,609</b>	<b>-0,589</b>	1

Les microorganismes inoculés (MI) ont un impact positif sur la fraction bioaccessible du Pb ( $r^2=0,345$ ) et en particulier sur les teneurs en Pb de la fraction F1 ( $r^2=0,594$ ) et ce, quelle que soit la technique d'inoculation (**tableau III.45**). Les concentrations en microorganismes hétérotrophes totaux rhizosphériques (MHT rhizo) sont corrélées positivement à la fraction bioaccessible du Cr ( $r^2=0,478$ ), aux teneurs en Cr dans F1 ( $r^2=0,293$ ) et en Cr et Pb dans F2 ( $r^2=0,404$  et  $r^2=0,433$ ). Pour le Cr F1 et F2 ainsi que pour le Pb de F2, la formulation de l'inoculum agit indirectement sur la mobilité des métaux *via* la croissance des MHT.

**Tableau III.45:** Coefficients de corrélation de Pearson regroupant les concentrations en microorganismes et les teneurs en métaux dans les fractions F1 et F2. Les valeurs en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$ . **MI** : microorganismes inoculés, **MHT** : microorganismes hétérotrophes totaux, **sol** : microorganismes dans le sol non rhizosphérique, **rhizo** : microorganismes dans le sol rhizosphérique.

	MI sol	MI rhizo	MHT sol	MHT rhizo
MI sol	1			
MI rhizo	<b>0,311</b>	1		
MHT sol	<b>0,593</b>	<b>0,294</b>	1	
MHT rhizo	-0,180	0,124	-0,035	1
Cr (F1+F2)	<b>-0,314</b>	0,062	-0,086	<b>0,478</b>
Pb (F1+F2)	<b>0,345</b>	-0,148	0,071	-0,087
CrF1	<b>-0,304</b>	0,206	0,041	<b>0,293</b>
CrF2	-0,242	0,019	-0,092	<b>0,404</b>
PbF1	<b>0,594</b>	-0,055	0,009	<b>-0,357</b>
PbF2	<b>-0,475</b>	-0,098	0,074	<b>0,433</b>

La biomasse foliaire du maïs est corrélée positivement à la concentration en MI ( $r^2=0,491$ ) et au MHT ( $r^2=0,440$ ) du sol (**tableau III.46**). Les microorganismes inoculés, en particulier les *Pseudomonas*, qui représentent 14% de la microflore totale rhizosphérique du maïs (Lambert *et al.* 1987), sont connus pour favoriser la croissance des végétaux notamment le maïs. De plus, l'ajout de substrat comme le lait écrémé a pu favoriser les bactéries qui assimilent rapidement les substrats carbonés, c'est à dire les stratégies **r**, dont font partie les *Pseudomonas*. L'effet PGPR, observé pour *P. aeruginosa* et *R. metallidurans*, peut être dû soit aux micrororganismes inoculés comme cela a été démontré *in vitro*, soit à des PGPR indigènes stimulées par l'apport de lait écrémé

Les teneurs en Cr et en Pb dans les feuilles et racines du maïs ne sont pas corrélées significativement aux concentrations en microorganismes inoculés ou totaux. En revanche la concentration en Hg dans les racines est corrélée positivement à la concentration en MI rhizosphériques ( $r^2=0,611$ ) et en MHT rhizosphériques ( $r^2=0,474$ ).

**Tableau III.46:** Coefficients de corrélation de Pearson regroupant les concentrations en microorganismes et les teneurs en métaux dans la plante. Les valeurs en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$ . **MI** : microorganismes inoculés, **MHT** : microorganismes hétérotrophes totaux, **sol** : microorganismes dans le sol non rhizosphérique, **rhizo** : microorganismes dans le sol rhizosphérique.

	Biomasse feuilles	Pb (mg/kg feuilles)	Cr (mg/kg feuilles)	Biomasse racines	Hg (mg/kg racine)	Pb (mg/kg racine)	Cr (mg/kg racine)
Biomasse feuilles	1						
Pb (mg/kg feuilles)	-0,187	1					
Cr (mg/kg feuilles)	-0,173	<b>0,689</b>	1				
Biomasse racines	<b>0,446</b>	-0,223	-0,251	1			
Hg (mg/kg racine)	-0,259	<b>0,365</b>	<b>0,388</b>	-0,117	1		
Pb (mg/kg racine)	0,008	-0,154	<b>-0,316</b>	0,201	-0,107	1	
Cr (mg/kg racine)	-0,027	-0,140	<b>-0,351</b>	0,224	-0,198	<b>0,769</b>	1
MI sol	<b>0,491</b>	0,171	0,174	0,062	-0,013	<b>-0,330</b>	<b>-0,363</b>
MI rhizo	-0,005	0,104	0,148	-0,037	<b>0,611</b>	-0,100	-0,170
MHT sol	<b>0,440</b>	-0,050	0,006	0,255	0,196	0,036	-0,021
MHT rhizo	-0,149	0,101	0,267	-0,034	<b>0,474</b>	0,140	0,000

### Conclusion

La survie de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* est augmentée par l'ajout de lait écrémé, que les cellules soient sous forme libres ou immobilisées. La modalité CI lec est la plus efficace pour *P. fluorescens* en terme de survie au bout de 8 semaines et de colonisation des racines de maïs.

Dans le sol utilisé pour cette étude, le facteur limitant vient de la faible bioaccessibilité des métaux. La bioaugmentation du sol avec *P. aeruginosa* ou *R. metallidurans* a permis d'augmenter la quantité de Pb dans la fraction échangeable F1 de 2,6 fois et 2,1 fois respectivement. L'inoculation de *P. fluorescens* et *R. metallidurans* a augmenté les teneurs en Pb et en Cr dans la fraction F2.

L'augmentation de la mobilité des métaux dans le sol grâce à l'inoculation de ces microorganismes peut être à l'origine de l'augmentation de la quantité de métaux extraits des métaux par les feuilles de maïs, en particulier pour le Pb. Le maïs cultivé sur un sol inoculé avec *P. aeruginosa* (modalité CI lec) et avec *R. metallidurans* (modalité CL lec) extrait respectivement 5,4 et 5,2 fois plus de Cr dans ses feuilles que le témoin. L'extraction du Pb par les feuilles de maïs cultivé sur un sol inoculé avec *P. aeruginosa* (modalité CI lec) est 3,8 fois supérieure à celle du témoin. Le taux d'extraction est également du à l'augmentation de biomasse en particulier avec l'inoculation de *P. aeruginosa* pour la modalité CI lec. L'inoculation du sol avec *R. metallidurans* et *P. aeruginosa* a également permis d'augmenter le facteur de translocation du Cr et du Pb. Cette augmentation peut être la conséquence directe de l'action des microorganismes ou une action indirecte sur la production de composés complexants par la plante, tels que les phytosidérophores ou les acides organiques, ces derniers pouvant faciliter le facteur de translocation du Cr et du Pb.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La qualité des sols agricoles français, en terme de contamination par les métaux, est en cours d'évaluation par des programmes de surveillance. Cette contamination, bien que touchant de grandes surfaces avec des concentrations en métaux plus faibles que celles recensées sur les sites industriels, a longtemps été ignorée. Pourtant un risque potentiel, voire avéré de transfert des métaux vers les productions végétales et vers la chaîne alimentaire a déjà été observé dans plusieurs cas.

La phytoremédiation des sols agricoles contaminés par des métaux est une technique adaptée à ces grandes surfaces peu contaminées, en raison notamment du maintien du potentiel agronomique des sols après traitement. Cette technique impose néanmoins des durées de traitements importantes, le plus souvent supérieures à dix ans. Le temps représente ainsi le facteur limitant majeur, en raison de la faible quantité de métaux disponibles dans le sol à un instant donné. L'association de la bioaugmentation à la phytoextraction a donc été testée, en utilisant des microorganismes connus pour leur capacité à augmenter la fraction métallique (Cr, Hg, Pb) à disposition des plantes. Des microorganismes ont été sélectionnés pour leur résistance aux métaux, aux concentrations d'un sol agricole qui contient 3, 15 et 4 fois plus de Cr, Hg et Pb que ne l'autorise l'arrêté du 08/01/1998 pour l'épandage de boues de station d'épuration. Les métaux présents dans ce sol sont très peu mobiles, puisque les fractions bioaccessibles, c'est à dire potentiellement biodisponibles, représentent moins de 2% du Cr total, majoritairement sous forme trivalente, moins de 2% du Hg total et moins de 10% du Pb total. Cette faible mobilité peut s'expliquer par la forme chimique des métaux mais également par la forte teneur en matière organique et en phosphates du sol, connus pour immobiliser les métaux.

Parmi les microorganismes testés, les microorganismes potentiellement producteurs de sidérophores sont les plus intéressants pour la mobilisation du Cr et du Pb dans les fractions échangeables du sol. De plus, ces microorganismes colonisent plus efficacement le sol en comparaison des microorganismes potentiellement producteurs d'acides organiques ou de biosurfactants.

La croissance de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* ainsi que l'activité des sidérophores produits par ces souches ont été optimisées par ajout de substrats tels que le fructose, le glycérol, le mannitol et le lait écrémé. Dans un milieu liquide contenant du Fe avec un mélange de métaux MT (Cr, Hg, Pb) aux concentrations de la fraction bioaccessible du sol d'étude, les substrats les plus efficaces sont le lait écrémé pour la croissance de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*; le fructose pour l'activité des sidérophores et le glycérol pour la production spécifique des sidérophores par les deux bactéries testées.



L'immobilisation de *P. aeruginosa* ou *P. fluorescens* dans des billes d'alginate de calcium stimule la production de sidérophores dans un milieu contenant du Fe avec ou sans MT comparé aux cultures de cellules libres. L'activité des sidérophores de *P. fluorescens* dans ce milieu augmente 1,9 et 1,6 fois, respectivement pour les cellules immobilisées avec ou sans lait écrémé par rapport aux cellules libres dans les mêmes conditions. Pour *P. aeruginosa*, l'immobilisation dans des billes avec lait écrémé multiplie même par 5 l'activité des sidérophores produits, par rapport aux cellules libres. En raison de l'adsorption à la surface des billes de plus de 90% du Cr, du Fe et du Pb et plus de 40% du Hg du milieu de culture, la toxicité potentielle des métaux pour les microorganismes immobilisés est moindre et la faible concentration en Fe à l'intérieur des billes permet de maintenir la production de sidérophores par les deux *Pseudomonas*.

Dans le sol contaminé, sans plante, l'ajout de lait écrémé favorise la croissance des cellules bactériennes, qu'elles soient libres ou immobilisées. L'immobilisation des cellules avec du lait écrémé permet d'augmenter la survie de *P. fluorescens* au bout de 8 semaines d'expérimentation par rapport aux autres modalités d'inoculation. L'ajout d'un substrat tel que le lait écrémé contribue également à augmenter la fraction mobile (F1) du Cr et du Pb dans le sol quelque soit l'inoculum.

Les essais avec un substrat sable/perlite stérile ont montré que l'inoculation de *P. aeruginosa* dans ce substrat sans métaux ou de *P. fluorescens* dans ce substrat avec métaux, augmentait la production de biomasses foliaire et racinaire du maïs par rapport au témoin. Cet effet PGPR peut être dû à la production de sidérophores mais également à la production de phytohormones. Le prélèvement de Pb par les feuilles de maïs a augmenté de 2,7 fois avec l'inoculation des pots avec *P. aeruginosa*, 2,4 fois avec *P. fluorescens* et 2 fois avec *R. metallidurans*. L'inoculation n'a pas eu d'effet globalement sur l'extraction du Cr par les feuilles, dans lesquelles aucune trace de Hg n'a par ailleurs été détectée.

Dans le sol agricole étudié, l'inoculation de cellules immobilisées de *P. aeruginosa* avec du lait écrémé, stimule la biomasse foliaire par rapport au témoin. L'inoculation avec *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* sous forme de cellules libres ou avec *R. metallidurans* sous forme de cellules libres avec du lait écrémé augmente respectivement la concentration en Cr dans les feuilles de maïs de 4,3 ; 3,4 et 4,4 fois par rapport à leurs témoins respectifs. De même l'inoculation des pots avec des cellules libres de *P. aeruginosa* ou de cellules immobilisées de *R. metallidurans* avec du lait écrémé augmente la concentration en Pb dans les feuilles de 3,4 et 3,2 fois respectivement. L'absorption de ces deux métaux est corrélée dans les feuilles et les racines

de maïs, probablement parce que ces métaux pénètrent de façon passive par la plante en même temps que les solutés.

Le facteur de translocation est multiplié par 6 environ pour le Cr et par 6,5 pour le Pb suite à l'inoculation du sol avec *P. aeruginosa*, quelle que soit la modalité d'inoculation. Le facteur de bioaccumulation du Cr est également augmenté pour les 3 microorganismes, quelle que soit la modalité d'inoculation, ainsi que celui du Pb pour les sols inoculés avec *P. aeruginosa*.

Le paramètre le plus important pour la phytoextraction est la quantité de métal extrait par les parties récoltables de la plante. L'inoculation du sol avec *P. aeruginosa* sous forme de cellules libres avec du lait écrémé permet d'augmenter la quantité de Cr extrait de 5,4 fois et celle de Pb de 3,8 fois par rapport au témoin. La modalité avec des cellules libres de *R. metallidurans* et du lait écrémé multiplie par 5,2 le prélèvement de Cr par les feuilles de maïs.

L'effet positif de la bioaugmentation sur la phytoextraction du Cr et du Pb par le maïs est démontré dans cette étude à la fois par l'augmentation de la biomasse aérienne du maïs, de la concentration en métaux dans les tissus végétaux, du facteur de translocation et par conséquent de la quantité totale extraite de Cr et de Pb. La modalité la plus efficace est l'inoculation de *P. aeruginosa* sous forme de cellules immobilisées avec du lait écrémé. Toutefois, l'effet direct des sidérophores sur le prélèvement des métaux par la plante n'est pas clairement démontré, leur production *in situ* n'ayant pas été quantifiée lors de cette étude.

A l'issue de ce travail, des perspectives intéressantes peuvent être suggérées, pour répondre à la fois à des questions fondamentales et à des préoccupations pratiques de mise en œuvre de ces technologies de remédiation des sols.

Concernant les approches plutôt fondamentales, il faut noter que peu d'études ont décrit l'activité réelle des sidérophores dans le sol et les quantités produites par les microorganismes en présence de métaux toxiques. Une perspective pour cette étude est de mieux comprendre les relations sol/microorganisme/plante vis-à-vis de ce métabolite, en suivant par exemple les populations productrices de sidérophores par des techniques d'analyse génétique des populations, telle que la TTGE (Thermal Temporal Gradient Electrophoresis) et en évaluant l'efficacité de sidérophores purifiés sur la mobilité des métaux. Les sidérophores étant surtout étudiés pour leur capacité de chélation du Fe, et par conséquent comme réserve potentielle pour la plante, il paraîtrait intéressant d'étudier simultanément le prélèvement du Fe par la plante et celui d'autres métaux.

Les effets de la présence ou non de métaux sur le fonctionnement de la rhizosphère, en particulier sur les relations plante-microorganismes devront être étudiés. Une étude de l'effet des

métaux sur la physiologie de *P. fluorescens* en présence ou non de maïs (utilisé comme plante modèle) est en cours (en partenariat avec le laboratoire Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, de l'Université Louis Pasteur, UMR 7156, ULP). Cette étude a permis de mettre en évidence chez *P. fluorescens* une quarantaine de protéines dont l'expression est régulée en réponse à la présence de métaux en mélange (Cr, Hg, Pb). Le rôle de ces protéines pourra être envisagé et notamment le régulateur *AhlR* dont l'expression est fortement augmentée en présence de métaux. Un mutant de ce gène est en construction pour comprendre le rôle de *AhlR* sur la physiologie de la bactérie (motilité, synthèse d'exopolysaccharides) et sa capacité à coloniser le maïs et à favoriser l'accumulation de métaux.

Enfin les mécanismes de communication entre les rhizobactéries et la plante au travers des composés exsudés pouvant jouer un rôle dans la phytoextraction, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'inoculation de microorganismes sur la qualité et la quantité des exsudats racinaires et notamment sur la production de composés chélatants de métaux tels que les acides organiques.

Dans une perspective d'application du procédé associant la bioaugmentation à la phytoextraction, plusieurs études peuvent être envisagées, notamment l'utilisation d'autres plantes que le maïs, couramment utilisées en phytoextraction et à forte biomasse, comme par exemple des *Brassicaceae* (*Brassica juncea* ou *Brassica napus*). Une co-culture de maïs et de *Brassica* pourra également être étudiée, le maïs pouvant assurer une aide à la colonisation du sol.

D'autres modalités d'inoculation pourraient être testées telle que la co-inoculation de lait écrémé et de bentonite dans les billes d'alginate de calcium, ou l'enrobage direct des graines de façon à favoriser la survie microbienne et la colonisation de la rhizosphère. Une co-inoculation de microorganismes rhizosphériques et non rhizosphériques pourrait aussi permettre d'augmenter l'efficacité de phytoextraction.

Enfin, comme tout procédé développé en laboratoire, sa validation à l'échelle pilote puis en plein champ devra être démontrée en testant le procédé dans différentes conditions (nature et teneurs en métaux, polycontaminations, texture du sol, etc.). Les risques potentiels de lixiviation des métaux devront être évalués à cette occasion.

Une bactérie équivalente à *P. aeruginosa* en terme de production de sidérophores devra être recherchée, *P. aeruginosa* étant un pathogène opportuniste. Cela pose globalement la question de la stratégie de sélection des microorganismes, en particulier des microorganismes producteurs de sidérophores. Ceux-ci pourront être sélectionnés directement à partir du sol rhizosphérique ou non rhizosphérique sur la parcelle contaminée étudiée puis cultivés en masse *ex situ* avant d'être réinoculés. La sélection des microorganismes pourra se faire dans un premier

temps *in vitro* pour tester l'affinité des microorganismes avec des exsudats racinaires synthétiques de différentes espèces végétales, leur taux de croissance, et la production de métabolites impliqués dans la mobilisation de métaux ou dans la rhizocompétence des microorganismes. Cette première sélection, relativement rapide, permettra ensuite de tester les capacités de microorganismes à mobiliser les métaux en microcosmes de sol et à évaluer leur survie dans le sol. Enfin les microorganismes retenus seront étudiés en couplage avec la ou les plantes les plus adaptées à leur croissance, en microcosmes de sol, puis à une échelle intermédiaire (pilote) et enfin en plein champ.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott L.K., Robson A.D.** (1991) Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **35**: 121-150.
- Abd-Allah M.H.** (1998) Growth and siderophore production in vitro of *Bradyrhizobium* (Lupin) strains under iron limitation. *European Journal of Soil Biology* **34**: 99-104.
- Abdallah M.A.** (1991) Pyoverdins and pseudobactins. In *CRC handbook of microbial iron chelates*. Winkelman, G. (ed). Boca Raton: CRC Press, . 139-153.
- Abou-Shanab R.A., Angle J.S., Delorme T.A., Chaney R.L., van Berkum P., Moawad H., Ghanem K., Ghazlan H.A.** (2003) Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytologist* **158**: 219-224.
- Abou-Shanab R.A.I., Angle J.S., Chaney R.L.** (2006) Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 2882-2889.
- Achouak W., Conrod S., Cohen V., Heulin T.** (2004) Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 872-879.
- ADEME** (1998) Epanchage des boues d'épuration urbaines. Aspects sanitaires environnementaux. In *Journées techniques ADEME* Vol. Journées techniques des 5 et 6 juin 1997 Paris: ADEME. 322p.
- Adriano D.C.** (1986) *Trace element in the terrestrial environment*. New-York: Springer Verlag, 533 p.
- Adriano D.C., Wenzel W.W., Vangronsfeld J., Bolan N.S.** (2004) Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* **122**: 121-142.
- AFNOR** (1994a) Qualité du sol - Détermination du pH. NF ISO 10390
- AFNOR** (1994b) Qualité du sol - Détermination de la teneur pondérale en matière sèche en eau - Méthode gravimétrique. NF ISO 11465
- AFNOR** (2002) Qualité du sol - Extraction des éléments en traces par une solution tamponnée de DTPA. NF ISO 14870.
- AFNOR** (2006) Qualité du sol - Prétraitement des échantillons pour analyses physico-chimiques. NF ISO 11464
- Agence européenne pour l'environnement** (2005) <http://dataservice.eea.europa.eu/dataservice>.
- Ager F.J., Ynsa M.D., Dominguez-Solis J.R., Gotor C., Respaldiza M.A., Romero L.C.** (2002) Cadmium localization and quantification in the plant *Arabidopsis thaliana* using micro-PIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* **189**: 494-498.
- Al-Shawi A.W., Dahl R.** (1999) Determination of total chromium in phosphate rocks by ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **850**: 137-141.
- Albrecht-Gary A.M., Blanc S., Rochel N., Ocaktan A.Z., Abdallah M.A.** (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of Pyoverdin PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic Chemistry* **32**: 6391-6402.
- Aldrich M.V., Gardea-Torresdey J.L., Peralta-Videa J.R., Parsons J.G.** (2003) Uptake and reduction of Cr(VI) to Cr(III) by Mesquite (*Prosopis* spp.): chromate-plant interaction in hydroponics and solid media Studied Using XAS. *Environmental Science and Technology* **37**: 1859-1864.
- Alkorta I., Garbisu C.** (2001) Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology* **79**: 273-276.
- Allen H.E., Yin Y.** (1998) Combining chemistry and biology to derive soil quality criteria for pollutants. In *16th World Congress of Soil Science*. Montpellier, Vol. 1915 p 8.
- Alloway B.J.** (1995) *Heavy metals in soils*. Londres: Blackie Academic and Professional. 368p.

- Amellal N., Bartoli F., Villemain G., Talouizte A., Heulin T.** (1999) Effects of inoculation of EPS-producing *Pantoea agglomerans* on wheat rhizosphere aggregation. *Plant and Soil* **211**: 93-101.
- Andersson I., Parkman H., Jernelov A.** (1990) The role of sediments as sink or source for environmental contaminants: A case study of mercury and chlorinated organic compounds. *Limnologica* **20**: 347-359.
- Andersson S., Nilsson S.I.** (2001) Influence of pH and temperature on microbial activity, substrate availability of soil-solution bacteria and leaching of dissolved organic carbon in a mor humus. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1181-1191.
- Araujo M.A.V., Mendonca-Hagler L.C., Hagler A.N., van Elsas J.D.** (1994) Survival of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* introduced into subtropical soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **13**: 205-216.
- Arica M.Y., Bayramoglu G., Yilmaz M., Bektas S., Genç Ö.** (2004) Biosorption of Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus *Funalia trogii*. *Journal of Hazardous Materials* **109**: 191-199.
- Arima K., Kakinuma A., Tamura G.** (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by : Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **31**: 488-494.
- Arnfolk P., Wasay S.A., Tokunaga S.** (1996) A comparative study of Cd, Cr(III), Cr(VI), Hg, and Pb uptake by minerals and soil materials. *Water, Air, & Soil Pollution* **87**: 131-148.
- Arrêté du 8 janvier 1998**, fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées, JO du 31 janvier 1998.
- Assche F., Clijsters H.** (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment* **13**: 195-206.
- Athalye V.V., Ramachandran V., D'Souza T.J.** (1995) Influence of chelating agents on plant uptake of <sup>51</sup>Cr, <sup>210</sup>Pb and <sup>210</sup>Po. *Environmental Pollution* **89**: 47-53.
- Awad F., Romheld V.** (2000) Mobilization of heavy metals from contaminated calcareous soils by plant born, microbial and synthetic chelators and their uptake by wheat plants. *Journal of Plant Nutrition* **23**: 1847-1855.
- Baakza A., Vala A.K., Dave B.P., Dube H.C.** (2004) A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **311**: 1-9.
- Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M.** (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* **134**: 307-319.
- Baize D.** (1997) *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols*. Paris: INRA. 408p.
- Baize D.** (2000) Teneurs totales en "métaux lourds" dans les sols français, résultats généraux du programme ASPITET. *Le Courrier de l'Environnement de l' INRA* **39**: 39-54.
- Baker A.J.M.** (1981) Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* **3**: 643-654.
- Baker A.J.M., Brooks R.R.** (1989) Terrestrial higher plants which accumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81-126.
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Sidoli C.M.D., Reeves R.D.** (1994) The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling* **11**: 41-49.
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Reeves R.D., Smith J.A.C.** (2000) Metal hyperaccumulator plants : a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted

soils, In : *Phytoremediation of contaminated soil and water*, Terry N. et Bañuelos G. (eds), Lewis Publisher, Boca Raton, FL, 85-107.

**Bakermans C., Madsen E.L.** (2002) Detection in coal tar waste-contaminated groundwater of mRNA transcripts related to naphthalene dioxygenase by fluorescent in situ hybridization with tyramide signal amplification. *Journal of Microbiological Methods* **50**: 75-84.

**Balabane M., Faivre D., van Oort F., Dahmani-Muller H.** (1999) Mutual effects of soil organic matter dynamics and heavy metals fate in a metallophyte grassland. *Environmental Pollution* **105**: 45-54.

**Banat I.M.** (1995) Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology* **51**: 1-12.

**Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S.** (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**: 495-508.

**Banks M.K., Schwab A.P., Henderson C.** (2006) Leaching and reduction of chromium in soil as affected by soil organic content and plants. *Chemosphere* **62**: 255-264.

**Bar-Ness E., Hadar Y., Chen Y., Shanzer A., Libman J.** (1992) Iron uptake by plants from microbial siderophores : a study with 7-nitrobenz-2 Oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. *Plant Physiology* **99**: 1329-1335.

**Bar-Ness R., Avrahamy N., Matsuyama T., Rosenberg M.** (1988) Increased cell surface hydrophobicity of a *Serratia marcescens* NS 38 mutant lacking wetting activity. *Journal of Bacteriology* **170**: 4361-4364.

**Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., van der Lelie D.** (2004) Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile organic pollutants. *Nature and Biotechnology* **22**: 583-588.

**Barkay T., Turner R., Saouter E., Horn J.** (1992) Mercury biotransformations and their potential for remediation of mercury contamination. *Biodegradation* **3**: 147-159.

**Barnhart J.** (1997) Occurrences, uses, and properties of chromium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **26**: S3-S7.

**Barona A., Aranguiz I., Elias A.** (2001) Metal associations in soils before and after EDTA extractive decontamination : implications for the effectiveness of further clean-up procedures. *Environmental Pollution* **113**: 79-85.

**Barry S.A.S., Clark S.C.** (1978) Problems of interpreting the relationship between the amounts of lead and zinc in plants and soil on metalliferous wastes. *New Phytologist* **81**: 773-783.

**Bartlett,R.J.** (1991) Chromium cycling in soils and water : links, gaps and methods. *Environmental Health Perspectives* **92**: 17-24.

**Barton L.L., Hemming B.C.** (1993) *Iron chelation in plants and soil microorganisms*. San Diego: Academic Press. 544 p.

**Bashan Y.** (1986) Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology* **51**: 1089-1098.

**Bashan Y.** (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* **16**: 729-770.

**Bashan Y., Hernandez J.-P., Leyva L., Bacilio M.** (2002) Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils* **35**: 359-368.

**Battke F., Ernst D., Halbach S.** (2005) Ascorbate promotes emission of mercury vapour from plants. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1487-1495.

**Baudoin E., Benizri E., Guckert A.** (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 1183-1192.

- Baumann A.** (1885) Das verhalten von zinksätzen gegen pflanzen und imboden, *Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen* **3**: 1-53.
- Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A., Egorova T.N., Matveyeva V.A., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A.,** (2001) Characterisation of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 642-652.
- Benizri E., Schoeny A., Picard C., Courtade A., Guckert A.** (1997) External and internal root colonization of maize by two *Pseudomonas* strains: enumeration by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Current Microbiology* **34**: 297-302.
- Benizri E., Courtade A., Guckert A.** (1995) Fate of two microorganisms in maize simulated rhizosphere under hydroponic and sterile conditions. *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 71-77.
- Bennicelli R., Stepniewska Z., Banach A., Szajnocha K., Ostrowski J.** (2004) The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water. *Chemosphere* **55**: 141-146.
- Berthelin J., Leyval C.** (2000) Contamination des milieux par les éléments en traces. Les conséquences sur les sols les eaux superficielles. *Compte-rendus de l'Académie d'Agriculture de France* **86**: 25-37.
- Bizily S.P., Rugh C.L., Summers A.O., Meagher R.B.** (1999) Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 6808-6813.
- Black H.** (1995) Absorbing possibilities : phytoremediation. *Environmental Health Perspectives* **103**: 1106-1108.
- Blaylock M.J.** (2000) Field demonstrations of phytoremediation of lead contaminated soils, In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*, Terry N., Bañuelos G. (eds), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1-12.
- Blaylock M.J., Salt D.E., Dushenkov S., Zakharova O., Gussman C., Kapulnik Y., Ensley B.D., Raskin I.** (1997) Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science and Technology* **31**: 860-865.
- Bloemberg G.V., O'Toole G.A., Lugtenberg B.J., Kolter R.** (1997) Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4543-4551.
- Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J.** (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 343-350.
- Bluskov S., Arocena J.M., Omotoso O.O., Young J.P.** (2005) Uptake, distribution, and speciation of chromium in *Brassica Juncea*. *International Journal of Phytoremediation* **7**: 153 - 165.
- Bodour A.A., Miller-Maier R.M.** (1998) Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **32**: 273-280.
- Bolan N.S., Adriano D.C., Natesan R., Koo B.J.** (2003) Effects of organic amendments on the reduction and phytoavailability of chromate in mineral soil. *Journal of Environmental Quality* **32**: 120-128.
- Bolan N.S., Duraisamy V.P.** (2003) Role of inorganic and organic soil amendments on immobilisation and phytoavailability of heavy metals: a review involving specific case studies. *Australian Journal of Soil Research* **41**: 533-555.
- Bossier P., Hofte M., Verstraete W.** (1988) Ecological significance of siderophores in soil. *Advances in Microbiological Ecology* **10**: 385-414.
- Bourelle P.H., Berthelin J.** (1998) *Contamination des sols par les éléments en trace : les risques et leur gestion*. Paris: Tec&Doc Lavoisier. **42**, 440p.



- Bourrié B., Tourliere P.Y., Bernhard-Bitaud C.** (1998) Etude au champ de la mobilisation par le maïs de Cd, Pb, Cu et Zn : résultat de 4 années d'expérimentation, Congrès mondial de Science du Sol, Montpellier, N° 1621.
- Bouwman L.A., Bloem J., Romkens P.F.A.M., Japenga J.** (2005) EDGA amendment of slightly heavy metal loaded soil affects heavy metal solubility, crop growth and microbivorous nematodes but not bacteria and herbivorous nematodes. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 271-278.
- Bowen G.D., Rovira A.D., Donald L.S.** (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* **66** : 1-102.
- Brandl H., Bosshard R., Wegmann M.** (2001) Computer-munching microbes: metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi. *Hydrometallurgy* **59**: 319-326.
- Braun V., Killmann H.** (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 104-109.
- Brennan M.A., Shelley M.L.** (1999) A model of the uptake, translocation, and accumulation of lead (Pb) by maize for the purpose of phytoextraction. *Ecological Engineering* **12**: 271-297.
- Briones A.M., Reichardt W.** (1999) Estimating microbial population counts by 'most probable number' using Microsoft Excel ®. *Journal of Microbiological Methods* **35**: 157-161.
- Brooks R.R., Chambers M.F., Nicks L.J., Robinson B.H.** (1998) Phytomining. *Trends in Plant Science* **3**: 359-362.
- Brown S.L., Chaney R.L., Angle J.S., Baker A.J.M.,** (1994) Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc-contaminated and cadmium-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* **23**: 1151-1157.
- Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W.** (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **45**: 198-207.
- Budzikiewicz H.** (1993) Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Letters* **104**: 209-228.
- Budzikiewicz H.** (1997) Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Zeitschrift für Naturforschung* **52c**: 713-720.
- Budzikiewicz H., Georgias H., Taraz K.** (2002) Diastereomeric pyoverdine-chromium(III) complexes. *Zeitschrift für Naturforschung* **57c**: 954-956.
- Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R.** (1998) A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3663-3668.
- Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R.** (2000) Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology* **46**: 237-245.
- Byers H.G.** (1935) Selenium occurrence in certain soils in the United States, with a discussion of the related topics. *US Department of Agriculture technical bulletin* **482**: 1-47.
- Calasans C.F., Malm O.** (1997) Elemental mercury contamination survey in a chlor-alkali plant by the use of transplanted Spanish moss, *Tillandsia usneoides* (L.). *Science of The Total Environment* **208**: 165-177.
- Cancela M.A., Alvarez E., Maceiras R.** (2003) Polymers in alimentary, industrial properties of the sodium alginate. *Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry* **2**: 380-387.
- Carlot M., Giacomini A., Casella S.** (2002) Aspects of plant-microbe interactions in heavy metal polluted soil. *Acta Biotechnologica* **22**: 13-20.
- Carmichael D., Christopher J., Hegenauer J., Saltman P.** (1975) Effect of milk and casein on the absorption of supplemental iron in the mouse and chick. *American Journal of Clinical Nutrition* **28**: 487-493.

- Carrillo-Castaneda G., Juarez Munoz J., Peralta-Videa J.R., Gomez E., Gardea-Torresday J.L.** (2005) Modulation of uptake and translocation of iron and copper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. *Journal of Plant Nutrition* **28**: 1853 - 1865.
- Cary E.E., Allaway W.H., Olson O.E.** (1977) Control of chromium concentrations in food plants. 1. Absorption and translocation of chromium by plants. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **25**: 300-304.
- Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T.** (1996) Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **16**: 79-101.
- Castro I.M., Fietto J.L.R., Vieira R.X., Tropia M.J.M., Campos L.M.M., Paniago E.B., Brandao R.L.** (2000) Bioleaching of zinc and nickel from silicates using *Aspergillus niger* cultures. *Hydrometallurgy* **57**: 39-49.
- Cavallini A., Natali L., Durante M., Maserti B.** (1999) Mercury uptake, distribution and DNA affinity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) plants. *The Science of The Total Environment* **243-244**: 119-127.
- CE N°466/2001**, directive fixant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec** (2004) Détermination du chrome hexavalent, méthode colorimétrique, méthode MA 200-CrHex 1.0, Ministère de l'environnement du Québec, 12 p.
- Cervantes C., Ohtake H., Chu L., Misra T.K., Silver S.** (1990) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *Journal of Bacteriology* **172**: 287-291.
- Cervantes C., Campos-Garcia J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C., Moreno-Sanchez R.** (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 335-347.
- Chandra Sekhar K., Kamala C.T., Chary N.S., Balaram V., Garcia G.** (2005) Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. *Chemosphere* **58**: 507-514.
- Chaney R.L., Brown J.C., Tiffin L.O.** (1972) Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiology* **50**: 208-213.
- Chaney R.L.** (1983) Plant uptake of inorganic waste. In : *Land treatment of hazardous waste*, Parr J.E. (ed), Noyes Data corp, Park Ridge, IL, 50-76.
- Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J.M.** (1997) Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 279-284.
- Chaney R.L., Li Y.M., Angle J.S., Baker A.J.M., Reeves R.D., Brown S.L., Homer F.A., Malik M., Chin M.** (2000) Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems : approaches and progress. In *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Terry N., Bañuelos G. (eds). Boca raton: Lewis Publisher, 129-158.
- Chang A.C., Warneke J.E., Page A.L., Lund L.J.** (1984) Accumulation of heavy metals in sewage sludge-treated soils. *Journal of Environmental Quality* **13**: 87-91.
- Chang J.-S., Law R., Chang C.-C.** (1997) Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research* **31**: 1651-1658.
- Chaussod P.** (1996) La qualité biologique des sols : évaluation implications. *Etude gestion des sols* **3**: 261-278.
- Checkai R., Corey R., Helmke P.** (1987) Effects of ionic and complexed metal concentrations on plant uptake of cadmium and micronutrient metals from solution. *Plant and Soil* **99**: 335-345.
- Chen H., Cutright T.** (2001) EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere* **45**: 21-28.

- Chen T.-L., Humphrey A.E.** (1988) Estimation of critical particle diameters for optimal respiration of gel entrapped and/or pelletized microbial cells. *Biotechnology Letters* **10**: 699-702.
- Chen Y.X., Lin Q., Luo Y.M., He Y.F., Zhen S.J., Yu Y.L., Tian G.M., Wong M.H.** (2003) The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere* **50**: 807-811.
- Chiarini L., Tabacchioni S., Bevivino A.** (1993) Interactions between rhizosphere microorganisms under iron limitation. *Archives of Microbiology* **160**: 68-73.
- Chiarini L., Bevivino A., Dalmastrri C., Nacamulli C., Tabacchioni S.** (1998) Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Applied Soil Ecology* **8**: 11-18.
- Chibata I., Tosa T., Sato T., Takata I., Klaus M.** (1987) Immobilization of cells in carrageenan. *Methods in Enzymology*. 135 : 189-198.
- Chlopecka A., Adriano D.C.** (1997) Influence of zeolite, apatite and Fe-oxide on Cd and Pb uptake by crops. *Science of The Total Environment* **207**: 195-206.
- Christofi N., Ivshina I.B.** (2002) Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology* **93**: 915-929.
- Chuan M.C., Shu G.Y., Liu J.C.** (1996) Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water, Air, & Soil Pollution* **90**: 543-556.
- Clark R.B., Zeto S.K.** (1996) Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 1505-1511.
- Clemens S., Palmgren M.G., Kramer U.** (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**: 309-315.
- Cline G.R., Powell P.E., Szanislo P.J., Reid C.P.P.** (1984) The effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by sunflower and sorghum. *Plant Physiology* **76**: 36-39.
- Cobbett C., Goldsbrough P.** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 159-182.
- Cooper D.G., Macdonald C.R., Duff S.J.B., Kosaric N.** (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 408-412.
- Corbisier P., van der Lelie D., Borremans B., Provoost A., de Lorenzo V., Brown N.L., Lloyd J.R., Hobman J.L., Csoregi E., Johansson G., Mattiasson B.** (1999) Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Analytica Chimica Acta* **387**: 235-244.
- Cornelis P., Matthijs S.** (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environmental Microbiology* **4**: 787-798.
- Cox C.D., Rinehart K.L., Moore M.L., Cook J.C.** (1981) Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**: 4256-4260.
- Coy M., Neilands J.B.** (1991) Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry* **30**: 8201-8210.
- Crowley D., Römheld V., Marschner H., Szanislo P.** (1992) Root-microbial effects on plant iron uptake from siderophores and phytosiderophores. *Plant and Soil* **142**: 1-7.
- Csillag J., Partay G., Lukacs A., Bujtas K., Nemeth T.** (1999) Extraction of soil solution for environmental analysis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **74**: 305-324.
- CTP,** (2001) Les boues d'épuration municipales leur utilisation en agriculture. Angers: ADEME, 58p.
- Cunningham J.E., Kuiack C.** (1992) Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1451-1458.

- Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W.** (1995) Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* **13**: 393-397.
- Cunningham S.D., Berti W.R.** (2000) Phytoextraction and phytostabilization: technical, economic, and regulatory considerations of soil-lead issue. In *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Terry N., Banuelos G. (eds). Boca Raton: Lewis Publishers. 359-376.
- Cuppels D.A., Stipanovic R.D., Stoessl A., Stothers J.B.** (1987) The constitution and properties of a pyochelin-zinc complex. *Canadian Journal of Chemistry* **65** : 2126-2130.
- Curl E.A., Truelove B.** (1986) *The Rhizosphere*. Berlin: Springer-Verlag, 288 p.
- Czaczyk K., Trojanowska K., Grajek W.** (1997) The influence of a specific microelemental environment in alginate gel beads on the course of propionic acid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**: 630-635.
- Dahlin S., Witter E.** (1998) Can the low microbial biomass C-to-organic C ratio in an acid and a metal contaminated soil be explained by differences in the substrate utilization efficiency and maintenance requirements? *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 633-641.
- Dahmani-Muller H., van Oort F., Gelie B., Balabane M.** (2000) Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* **109**: 231-238.
- Dahmani-Muller H., van Oort F., Balabane M.** (2001) Metal extraction by *Arabidopsis halleri* grown on an unpolluted soil amended with various metal-bearing solids: a pot experiment. *Environmental Pollution* **114**: 77-84.
- Dakora F.D., Phillips D.A.** (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* **245**: 35-47.
- Dalton P.A., Smith R.J., Truong P.N.V.** (1996) Vetiver grass hedges for erosion control on a cropped flood plain: hedge hydraulics. *Agricultural Water Management* **31**: 91-104.
- Dan T.V.** (2001) Phytoremediation of metal contaminated soils : metal tolerance and metal accumulation in *Pelargonium sp.* University of Guelph, 189p.
- Dao K.-H.T., Hamer K.E., Clark C.L., Harshman L.G.** (1999) Pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa* exposed to metals or an oxidative stress agent. *Ecological Applications* **9**: 441-448.
- Darmendrail D., Baize D., Barbier J., Freyssinet P., Mouvet C., Salpéteur I., Wavrer P.** (2000) Fond géochimique naturel : état des connaissances à l'échelle nationale. BRGM/RP-50158-FR, 93p.
- Daughney C.J., Fein J.B.** (1998) The effect of ionic strength on the adsorption of  $H^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , and  $Cu^{2+}$  by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* : a surface complexation model. *Journal of Colloid and Interface Science* **198**: 53-77.
- Décret n°971133 du 8 décembre 1997** relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. JO du 10 décembre 1997.
- De Leij F., Sutton E.J., Whipps J.M., Fenlon J.S., Lynch J.M.** (1995) Impact of field release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on indigenous microbial populations of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 3443-3453.
- De Souza M.P., Huang C.P.A., Chee N., Terry N.** (1999) Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants. *Planta* **209**: 259-263.
- Deikman J.** (1997) Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiologia Plantarum* **100**: 561-566.
- Del Rio-Celestino M., Font R., Moreno-Rojas R., De Haro-Bailon A.** (2006) Uptake of lead and zinc by wild plants growing on contaminated soils. *Industrial Crops and Products* **24**: 230-237.
- Dembczynski R., Jankowski T.** (2000) Characterisation of small molecules diffusion in hydrogel-membrane liquid-core capsules. *Biochemical Engineering Journal* **6**: 41-44.

- Deneux-Mustin S., Roussel-Debet S., Mustin C., Henner P., Munier-Lamy C., Colle C., Berthelin J., Garnier-Laplace J., Leyval C.** (2003) *Mobilité transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol*. Paris: Tec & Doc, 282p.
- Desai J.D., Banat I.M.** (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 47-64.
- Desjardin V., Bayard R., Huck N., Manceau A., Gourdon R.** (2002) Effect of microbial activity on the mobility of chromium in soils. *Waste Management* **22**: 195-200.
- Devliegher W., Arif M.A.S., Verstraete W.** (1995) Survival and plant growth promotion of detergent-adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* SNK2, *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 3865-3871.
- Di Gregorio S., Barbafieri M., Lampis S., Sanangelantoni A.M., Tassi E., Vallini G.** (2006) Combined application of Triton X-100 and *Sinorhizobium* sp. Pb002 inoculum for the improvement of lead phytoextraction by *Brassica juncea* in EDTA amended soil. *Chemosphere* **63**: 293-299.
- Di Simine C.D., Sayer J.A., Gadd G.M.** (1998) Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. *Biology and Fertility of Soils* **28**: 87-94.
- Diaz-Ravina M., Baath E., Frostegard A.** (1994) Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2238-2247.
- Díaz de Villegas M.E., Villa P., Frías A.** (2002) Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS *Revista Latinoamericana de Microbiologia* **44**: 112-117.
- Diels L., De Smet M., Hooyberghs L., Corbisier P.** (1999) Heavy metals bioremediation of soil. *Molecular Biotechnology* **12**: 149-158.
- Dong Y., Ma L.Q., Rhue R.D.** (2000) Relation of enhanced Pb solubility to Fe partitioning in soils. *Environmental Pollution* **110**: 515-522.
- Dronnet V.M., Renard C.M.G.C., Axelos M.A.V., Thibault J.F.** (1997) Binding of divalent metal cations by sugar-beet pulp. *Carbohydrate Polymers* **34**: 73-82.
- Dubbin W.E., Ander E.L.** (2003) Influence of microbial hydroxamate siderophores on Pb(II) desorption from  $\alpha$ -FeOOH. *Applied Geochemistry* **18**: 1751-1756.
- Dubourguier H.C., Petit D., Deram A., Logeay C., Allard V., Lefrançois A.** (2001) Le phytomanagement : éléments de synthèse, Pôles de compétence sites et sédiments pollués, *Les cahiers techniques / Pôle de compétence Sites et sédiments pollués en région Nord-Pas-de-Calais*, 50 p.
- Dudka S., Miller W.P.** (1999) Accumulation of potentially toxic elements in plants and their transfer to human food chain. *Journal of Environmental Science and Health B* **34**: 681-708.
- Duffy B.K., Défago G.** (1997) Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology* **87**: 1250-1257.
- Duffy B.K., Défago G.** (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2429-2438.
- Duijff B.J., Bakker P.A.H.M., Schippers B.** (1991) Influence of pseudobactin-358 on the iron nutrition of plants. In *6th International Fe Symposium*. Vol. 31.
- Duquenne P., Parekh N.R., Catroux G., Fournier J.-C.** (1996) Effect of inoculant density, formulation, dispersion and soil nutrient amendment on the removal of carbofuran residues from contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 1805-1811.
- Duquenne P., Cartroux G.** (1998) Study of competition between two bacterial strains in irradiated soil : use of microgranules amended with specific substrates. In *16th World congress of soil science Montpellier*.

- Duquenne P., Chenu C., Richard G., Catroux G.** (1999) Effect of carbon source supply and its location on competition between inoculated and established bacterial strains in sterile soil microcosm. *FEMS Microbiology Ecology* **29**: 331-339.
- Dursun A.Y., Uslu G., Cuci Y., Aksu Z.** (2003) Bioaccumulation of copper(II), lead(II) and chromium(VI) by growing *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* **38**: 1647-1651.
- Dushenkov V., Kumar P.B.A.N., Motto H., Raskin I.** (1995) Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science and Technology* **29**: 1239-1245.
- Duss F., Mozafar A., Oertli J.J., Jaeggi W.** (1986) Effect of bacteria on the iron uptake by axenically-cultured roots of Fe-efficient and Fe-inefficient tomatoes (*Lycopersicon esculentum* mill.). *Journal of Plant Nutrition* **9**: 587-598.
- Egamberdiyeva D., Juraeva D., Gafurova L., Höflich G.** (2002) Promotion of plant growth of maize by plant growth promoting bacteria in different temperature and soils, In : Making conservation tillage conventional : building a future on 25 years of research. In *25th annual southern conservation tillage conference for sustainable agriculture*. Van Santen E. (ed.) Auburn, USA, 24-26 June.
- El-Kherbawy M., Angle J.S., Heggo A., Chaney R.L.** (1989) Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biology and Fertility of Soils* **8**: 61-65.
- El-Komy H.M.A.** (2005) Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technology and Biotechnology* **43**: 19-27.
- El Fantroussi S., Agathos S.N.** (2005) Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology* **8**: 268-275.
- Elless M.P., Blaylock M.J.** (2000) Amendment optimization to enhance lead extractability from contaminated soils for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **2**: 75-89.
- EPA** (2000) Introduction to phytoremediation. Environmental Protection Agency. EPA/600/R-99/107
- Epstein A., Gussman C., Blaylock M., Yermiyahu U., Huang J., Kapulnik Y., Orser C.** (1999) EDTA and Pb—EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb—amended soil. *Plant and Soil* **208**: 87-94.
- Evans K.M., Gatehouse J.A., Lindsay W.P., Shi J., Tommey A.M., Robinson N.J.** (1992) Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMTA* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: Implications for *PsMTA* function. *Plant Molecular Biology* **20**: 1019-1028.
- Faramarzi M.A., Stagars M., Pensini E., Krebs W., Brandl H.** (2004) Metal solubilization from metal-containing solid materials by cyanogenic *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Biotechnology* **113**: 321-326.
- Fargašová A.** (2001) Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis Alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. *Biologia Plantarum* **44**: 471-473.
- Fein J.B., Daughney C.J., Yee N., Davis T.A.** (1997) A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica Cosmochimica Acta* **61**: 3319-3328.
- Fendorf S., La Force M.J., Li G.** (2004) Temporal changes in soil partitioning and bioaccessibility of arsenic, chromium, and lead. *Journal of Environmental Quality* **33**: 2049-2055.
- Feng M.-H., Shan X.-Q., Zhang S.-Z., Wen B.** (2005) Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere* **59**: 939-949.
- Filgueiras A.V., Lavilla I., Bendicho C.** (2002) Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples. *Journal of Environmental Monitoring* **4**: 823-857.
- Fischerova Z., Tlustos P., Jirina S., Kornelie S.** (2006) A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environmental Pollution* **144**: 93-100.

- Fodor F., Cseh E., Varga A., Záray G.Y.** (1998) Lead uptake, distribution, and remobilization in cucumber. *Journal of Plant Nutrition* **21**: 1363-1373.
- Forstner U.** (1995) Land contamination by heavy metals: Global scope and magnitude of problem, In: *Metal speciation and contamination of soils*. Allen H.E. (ed) Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1-33.
- Fouilleux G., Revellin C., Cartroux G.** (1994) Short-term recovery of *Bradyrhizobium japonicum* during an inoculation process using mineral microgranules. *Canadian Journal of Microbiology* **40**: 322-325.
- Francis A.J., Dodge C.J.** (1987) Effects of lead oxide and iron on glucose fermentation by *Clostridium* sp. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**: 491-497.
- Fravel D.R., Marois J.J., Lumsden R.D., Connick W.J.** (1985) Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology* **75**: 774-777.
- Fray R.G., Throup J.P., Daykin M., Wallace A., Williams P., Stewart G.S.A.B., Grierson D.** (1999) Plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones communicate with bacteria. *Nature Biotechnology* **17**: 1017-1020.
- Gadd G.M., White C.** (1993) Microbial treatment of metal pollution—a working biotechnology? *Tibtech* **11**: 353-359.
- Gadd G.M., Poole R.K.** (1999) Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Advances in Microbial Physiology* **41** : 47-92.
- 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.
- Galimska-Stypa R., Sas-Nowosielska A., Kucharski R., Dushenkov S.** (2000) Ecological risks caused by application of EDTA to soil. In *Fifth International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe*. Prague. Vol. N° 754.
- Galli U., Schüepp H., Brunold C.** (1995) Thiols of Cu-treated maize plants inoculated with the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Physiologia Plantarum* **94**: 247-253.
- Garbisu C., Alkorta I.** (2001) Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* **77**: 229-236.
- Gardea-Torresdey J.L., Peralta-Videa J.R., Montes M., de la Rosa G., Corral-Diaz B.** (2004) Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresource Technology* **92**: 229-235.
- Gardin H., Pauss A.** (2001) □-carrageenan/gelatin gel beads for the co-immobilization of aerobic and anaerobic microbial communities degrading 2,4,6-trichlorophenol under air-limited conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**: 517-523.
- Gentry T.J., Rensing C., Pepper I.L.** (2004) New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **34**: 447-494.
- Georgiou G., Lin S.-C., Sharma M.M.** (1992) Surface-active compounds from microorganisms. *Nature Biotechnology* **10**: 60-65.
- Ghosh M., Singh S.P.** (2005a) Comparative uptake and phytoextraction study of soil induced chromium by accumulator and high biomass weed species. *Applied Ecology and Environmental Research* **3**: 67-79.
- Ghosh M., Singh S.P.** (2005b) A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts *Applied Ecology and Environmental Research* **3**: 1-18.
- Gisbert C., Ros R., De Haro A., Walker D.J., Pilar Bernal M., Serrano R., Navarro-Avino J.** (2003) A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**: 440-445.

- Giulio R.T., Ryan E.A.** (1987) Mercury in soils, sediments, and clams from a North Carolina peatland. *Water, Air, & Soil Pollution* **33**: 205-219.
- Glass D.J.** (2000) Economic potential of phytoremediation, In: *Phytoremediation of toxic metals using plants to clean up the environment*,. Raskin I., Ensley B.D. (eds). New York: Wiley J. & Sons, 15-31
- Glazer A.N., Nikaido H.** (1995) Microbial Biotechnology. In *Fundamentals of Applied Microbiology*. Berkeley: Freeman W.H and Company, 608p.
- Gleba D., Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Kneer R., Poulev A., Skarzhinskaya M., Dushenkov S., Logendra S., Gleba Y.Y., Raskin I.** (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 5973-5977.
- Glick B.R.** (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **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. *Journal of Theoretical Biology* **190**: 63-68.
- Glick B.R.** (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* **21**: 383-393.
- Glick B.R., Patten C.L., Holgin G., Penrose D.M.,** (1999) *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. London: Imperial College Press, 267p.
- Gobran G.R., Wenzel W.W., Lombi E.** (2001) *Trace elements in the rhizosphere*. Boca Raton: CRC Press, 321p.
- Goldstein R.M., Mallory L.M., Alexander M.** (1985) Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 977-983.
- Gomez C., Bosecker K.** (1999) Leaching heavy metals from contaminated soil by using *Thiobacillus ferrooxidans* or *Thiobacillus thiooxidans*. *Geomicrobiology Journal* **16**: 233-244.
- Gotoh T., Matsushima K., Kikuchi K.-I.** (2004) Adsorption of Cu and Mn on covalently cross-linked alginate gel beads. *Chemosphere* **55**: 57-64.
- Gram L.** (1996) The influence of substrate on siderophore production by fish spoilage bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **25**: 199-205.
- Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A., Smith P.J.C., Thom D.** (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters* **32**: 195-198.
- Grayston S.J., Vaughan D., Jones D.** (1997) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* **5**: 29-56.
- Grčman H., Velikonja-Bolta Š., Vodnik D., Kos B., Leštan, D.** (2001) EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil* **235**: 105-114.
- Grichko V.P., Filby B., Glick B.R.** (2000) Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology* **81**: 45-53.
- Gries D., Brunn S., Crowley D.E., Parker D.R.** (1995) Phytosiderophore release in relation to micronutrient metal deficiencies in barley. *Plant and Soil* **172**: 299-308.
- Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H.** (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**: 439-443.
- Groleau-Renaud V., Plantureux S., Tubeileh A., Guckert A.** (2000) Influence of microflora and composition of root bathing solution on root exudation of maize plants. *Journal of Plant Nutrition* **23**: 1283-1301.
- Grunwald P., Hansen K., GunBer W.** (1997) The determination of effective diffusion coefficients in a polysaccharide matrix used for the immobilization of biocatalysts. *Solid State Ionics* **101-103**: 863-867.



- Guan L.L., Onuki H., Kamino K.** (2000) Bacterial growth with exogenous siderophore and synthetic N-Acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2797-2803.
- Guerinot M.L., Meidl E.J., Plessner O.** (1990) Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* **172**: 3298-3303.
- Guerinot M.L.** (1994) Microbial iron transport. *Annual Review of Microbiology* **48**: 743-772.
- Guiné V., Martins J.** (2003) Contribution de deux colloïdes bactériens au transport rapide du mercure, zinc cadmium dans les sols. In *Devenir effets des contaminants métalliques dans les agrosystèmes écosystèmes terrestres*. INRA (ed.) Lille, 25.
- Guo Y., George E., Marschner H.** (1996) Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of cadmium and nickel in bean and maize plants. *Plant and Soil* **184**: 195-205.
- Gupta A.K., Sinha S.** (2006) Chemical fractionation and heavy metal accumulation in the plant of *Sesamum indicum* (L.) var. T55 grown on soil amended with tannery sludge: Selection of single extractants. *Chemosphere* **64**: 161-173.
- Gupta R., Aten R.** (1993) Comparison and evaluation of extraction media and their suitability in a simple model to predict the biological relevance of heavy metal concentrations in contaminated soils. *International Journal of Environment and Analytical Chemistry* **51**: 25-46.
- Habte M., Alexander M.** (1975) Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**: 159-164.
- Hall B.M., McLoughlin A.J., Leung K.T., Trevors J.T., Lee H.** (1998) Transport and survival of alginate-encapsulated and free *lux-lac* marked *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr cells in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **26**: 51-61.
- Hall J.L.** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11.
- Halstead R.L., Finn B.J., McLean A.J.** (1969) Extractability of nickel added to the soils and its concentration in plants. *Canadian Journal of Soil Science* **49**: 335-342.
- Han F.X., Sridhar B.B.M., Monts D.L., Su Y.** (2004) Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. *New Phytologist* **162**: 489-499.
- Han F.X., Su Y., Monts D.L., Waggoner C.A., Plodinec M.J.** (2006) Binding, distribution, and plant uptake of mercury in a soil from Oak Ridge, Tennessee, USA. *Science of The Total Environment* **368**: 753-768.
- Han Y., Kingston H.M., Boylan H.M., Rahman G.M.M., Shah S., Richter R.C., Link D.D., Bhandari S.** (2003) Speciation of mercury in soil and sediment by selective solvent and acid extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **375**: 428-436.
- Hantke K.** (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 172-177.
- Harris D., Paul E.A.** (1994) Measurement of bacterial growth rates in soil. *Applied Soil Ecology* **1**: 277-290.
- Hartwig U.A., Joseph C.M., Phillips D.A.** (1991) Flavonoids released naturally from Alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* **95**: 797-803.
- Hassen A., Saidi N., Cherif M., Boudabous A.** (1998) Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology* **65**: 73-82.
- Haynes R.J.** (1990) Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil* **126**: 247-264.
- He Z.L., Yang X.E., Stoffella P.J.** (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **19**: 125-140.

- Heggo A., Angle J.S., Chaney R.L.** (1990) Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biology and Biochemistry* **22**: 865-869.
- Heijnen C.E., van Veen J.A.** (1991) A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiology Letters* **85**: 73-80.
- Heitzer A., Sayler G.S.** (1993) Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends in Biotechnology* **11**: 334-343.
- Henry J.R.** (2000) An overview of the phytoremediation of lead and mercury. US-EPA, 51p.
- Herman D.C., Artiola J.F., Miller R.M.** (1995) Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental Science and Technology* **29**: 2280-2285.
- Hesterberg D.** (1998) Biogeochemical cycles and processes leading to changes in mobility of chemicals in soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **67**: 121-133.
- Hinchman R.R., Negri M.C., Gatliff E.G.** (1998) Phytoremediation : using green plants to cleanup contaminated soil, groundwater and wastewater. Illinois: Argonne national laboratory, 10p.
- Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B.** (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* **248**: 43-59.
- Hintelmann H., Welbourn P.M., Evans R.D.** (1995) Binding of methylmercury compounds by humic and fulvic acids. *Water, Air, & Soil Pollution* **80**: 1031-1034.
- Hirsch R.E., Lewis B.D., Spalding E.P., Sussman M.R.** (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**: 918-921.
- Hissler C.** (2003) Thèse : Dynamique bilan des flux de mercure dissous particulière dans un hydrosystème anthropisé. Cas du bassin versant de la Thur (Sud du Massif Vosgien). Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Hoagland D.R., Arnon D.I.** (1938) The water-culture method for growing plants without soil, Circular of California University Agricultural Experiment Station, **347**: 1-39.
- Höflich G., Wiehe W., Kühn G.** (1994) Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* **50**: 897-905.
- Höflich G., Metz R.** (1997) Interactions of plant-microorganism-associations in heavy metal containing soils from sewage farms. *Die Bodenkultur* **48**: 239-247.
- Hofte M., Dong Q., Kourambas S., Krishnapillai V., Sherratt D., Mergeay M.** (1994) The *sss* gene product, which affects pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, is a site-specific recombinase. *Molecular Microbiology* **14**: 1011-1020.
- Höfte M., Buysens S., Koedam N., Cornelis P.** (1993) Zinc affects siderophore-mediated high affinity iron uptake systems in the rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *BioMetals* **6**: 85-91.
- Howe R., Evans R.L., Ketteridge S.W.** (1997) Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **135**: 123-131.
- Hu N., Li Z., Huang P., Tao C.** (2006) Distribution and mobility of metals in agricultural soils near a copper smelter in South China. *Environmental Geochemistry and Health* **28**: 19-26.
- Huang J.W., Cunningham S.D.** (1996) Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* **134**: 75-84.
- Huang J.W., Chen J., Berti W.R., Cunningham S.D.** (1997) Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology* **31** : 800-805
- Ibanez J.P., Umetsu Y.** (2004) Uptake of trivalent chromium from aqueous solutions using protonated dry alginate beads. *Hydrometallurgy* **72**: 327-334.
- Imssande J.** (1998) Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: a need for an integrative approach in plant physiology. *Physiologia Plantarum* **103**: 139-144.

- James B.R., Bartlett R.J.** (1984) Plant-soil interactions of chromium. *Journal of Environmental Quality* **13**: 67-70.
- Jézéquel K.** (2003) Thèse : Bioaugmentation d'un sol agricole par des microorganismes libres ou immobilisés en vue de réduire la phytodisponibilité potentielle du cadmium. Université de Haute-Alsace, Colmar, 147p.
- Ji G., Silver S.** (1995) Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **14**: 61-75.
- Jiang X.J., Luo Y.M., Zhao Q.G., Baker A.J.M., Christie P., Wong M.H.** (2003) Soil Cd availability to Indian mustard and environmental risk following EDTA addition to Cd-contaminated soil. *Chemosphere* **50**: 813-818.
- Johansson J.F., Paul L.R., Finlay R.D.** (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 1-13.
- Joner E.J., Leyval C.** (1997) Uptake of <sup>109</sup>Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae*/Trifolium *subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytologist* **135**: 353-360.
- Joner E.J., Leyval C.** (2001) Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biology and Fertility of Soils* **33**: 351-357.
- Jurkevitch E., Hadar Y., Chen Y.**, (1988) Involvement of bacterial siderophores in the remedy of lime-induced chlorosis in peanut. *Soil Science Society of America Journal* **52**: 1032-1037.
- Juste C., Mench M.** (1992) Long-term application of sewage sludge and its effects on metal uptake by crops. In *Biogeochemistry of trace metals. Advances in trace substances research*. Adriano, D.C. (ed). London: Lewis Publishers, 159-193.
- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M., Mocquot B.** (1995) *Les micropolluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines*. ADEME (ed) Paris, 209 p.
- Kabata-Pendias A., Pendias H.** (1992) *Trace Elements in Soils and Plants*. Boca Raton: CRC Press 365p.
- Kacar Y., Arpa C., Tan S., Denizli A., Genc O., Arica M.Y.** (2002) Biosorption of Hg(II) and Cd(II) from aqueous solutions: comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* **37**: 601-610.
- Kaegi J.H.R., Schaeffer A.** (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **27**: 8509-8515.
- Kalembkiewicz J., Socco E.** (2002) Investigations of sequential extraction of chromium from soil. *Polish Journal of Environmental Studies* **11**: 245-250.
- Kamnev A.A., van der Lelie D.** (2000) Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Bioscience Reports* **20**: 239-258.
- Kaneko Y., Thoendel M., Olakanmi O., Britigan B.E., Singh P.K.** (2007) The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *Journal of Clinical Investigation* **117**: 877-888.
- Karenlampi S., Schat H., Vangronsveld J., Verkleij J.A.C., van der Lelie D., Mergeay M., Tervahauta A.I.** (2000) Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental Pollution* **107**: 225-231.
- Keller C., Hammer D.** (2005) Alternatives for phytoextraction : biomass plants versus hyperaccumulators. *Geophysical Research Abstracts* **7**.
- Kennedy I.R., Choudhury A.T.M.A., Kecskés M.L.** (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 1229-1244.
- Khan A.G., Kuek C., Chaudhry T.M., Khoo C.S., Hayes W.J.** (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* **41**: 197-207.

- 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.
- Khan F.I., Husain T., Hejazi R.** (2004) An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management* **71**: 95-122.
- Khan M.R., Khan S.M.** (2002) Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato. *Bioresource Technology* **85**: 213-215.
- Kheboian C., Bauer C.F.** (1987) Accuracy of selective extraction procedures for metal speciation in model aquatic sediments. *Analytical Chemistry* **59**: 1417-1423.
- Kierstan M., Bucke C.** (1977) The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering* **19**: 387-397.
- Kim K.Y., Jordan D., McDonald G.A.** (1998) *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 995-1003.
- Kinnersley A.M.** (1993) The role of phytochelates in plant growth and productivity. *Plant Growth Regulation* **12**: 207-218.
- Klein D., Frederick B., Biondini M., Trlica M.** (1988) Rhizosphere microorganism effects on soluble amino acids, sugars and organic acids in the root zone of *Agropyron cristatum*, *A. smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Plant and Soil* **110**: 19-25.
- Kloepper J.W.** (2003) A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. In *6th International PGPR Workshop*. Calicut, India, 5-10 december. Section VI 81-92.
- Knight B., Zhao F.J., McGrath S.P., Shen Z.G.** (1997) Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effects on the concentration and chemical speciation of metals in soil solution. *Plant and Soil* **197**: 71-78.
- Kowalchuk G., Buma D., de Boer W., Klinkhamer P., van Veen J.** (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 509-520.
- Kozdroj J., van Elsas J.D.** (2000) Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1405-1417.
- Krafczyk I., Trolldenier G., Beringer H.** (1984) Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* **16**: 315-322.
- Krämer 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* **379**: 635-638.
- Krämer U., Grime G.W., Smith J.A.C., Hawes C.R., Baker A.J.M.** (1997) Micro-PIXE as a technique for studying nickel localization in leaves of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **130**: 346-350.
- Krämer U., Chardonens A.N.** (2001) The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**: 661-672.
- Kuiper I., Legendijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J.** (2004) Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 6-15.
- Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H., Raskin I.** (1995) Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* **29**: 1232-1238.
- Küpper H., Lombi E., Zhao F.-J., McGrath S.P.** (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* **212**: 75-84.
- Lambert B., Leyns F., Van Rooyen L., Gossele F., Papon Y., Swings J.** (1987) Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 1866-1871.

- Lang F., Kaupenjohann I.** (2001) The limitations of solubility constants to calculate Pb mobility at high polluted sites. In *ICOBTE 56th* Guelph.
- Latour X., Corberand T., Laguerre G., Allard F., Lemanceau P.** (1996) The composition of fluorescent Pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2449-2456.
- Latour X., Delorme S., Mirleaub P., Lemanceau P.** (2003) Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies *Agronomie* **23**: 397-405.
- Lavado R.S., Porcelli C.A., Alvarez R.** (2001) Nutrient and heavy metal concentration and distribution in corn, soybean and wheat as affected by different tillage systems in the Argentine Pampas. *Soil and Tillage Research* **62**: 55-60.
- Lear G., Harbottle M.J., Sills G., Knowles C.J., Semple K.T., Thompson I.P.** (2007) Impact of electrokinetic remediation on microbial communities within PCP contaminated soil. *Environmental Pollution* **146**: 139-146.
- Lebeau T., Bagot D., Jezequel K., Fabre B.** (2002) Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. *The Science of The Total Environment* **291**: 73-83.
- Lee M.-K., Saunders J.A.** (2003) Effects of pH on metals precipitation and sorption: field bioremediation and geochemical modeling approaches. *Vadose Zone Journal* **2**: 177-185.
- Lendvay J.M., Loffler F.E., Dollhopf M., Aiello M.R., Daniels G., Fathepure B.Z., Gebhard M., Heine R., Helton R., Shi J., Krajmalnik-Brown R., Major C.L., Barcelona M.J., Petrovskis E., Hickey R., Tiedje J.M., Adriaens P.** (2003) Bioreactive barriers: a comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environmental Science and Technology* **37**: 1422-1431.
- Leong J.** (1986) Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **24**: 187-209.
- Leung K.T., So J.-S., Kostrzynska M., Lee H., Trevors J.T.** (2000) Using a green fluorescent protein gene-labeled p-nitrophenol-degrading *Moraxella* strain to examine the protective effect of alginate encapsulation against protozoan grazing. *Journal of Microbiological Methods* **39**: 205-211.
- Leung W., Chua H., Lo W.** (2001) Biosorption of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **91-93**: 171-184.
- Leveau J.H.J., Lindow S.E.** (2002) Bioreporters in microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 259-265.
- Lewandowski I., Schmidt U., Londo M., Faaij A.** (2006) The economic value of the phytoremediation function - Assessed by the example of cadmium remediation by willow (*Salix* spp). *Agricultural Systems* **89**: 68-89.
- Leyval C., Turnau K., Haselwandter K.** (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139-153.
- Li X., Thornton I.** (2001) Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Applied Geochemistry* **16**: 1693-1706.
- Lin C.-C., Lin H.-L.** (2005) Remediation of soil contaminated with the heavy metal (Cd<sup>2+</sup>). *Journal of Hazardous Materials* **122**: 7-15.
- Lindberg S.E., Turner R.R., Meyers T.P., Taylor G.E., Schroeder W.H.** (1991) Atmospheric concentrations and deposition of Hg to A deciduous forest atwalker branch watershed, Tennessee, USA. *Water, Air, & Soil Pollution* **56**: 577-594.
- Lindhal V., Bakken L.R.** (1995) Evaluation of methods for extraction of bacteria in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 135-142.

- Lindqvist O., Johansson K., Bringmark L., Timm B., Aastrup M., Andersson A., Hovsenius G., Håkanson L., Iverfeldt Å., Meili M.** (1991) Mercury in the Swedish environment — Recent research on causes, consequences and corrective methods. *Water, Air, & Soil Pollution* **55**: xi-261.
- Lindsay W.L.** (1979) *Chemical equilibria in soils*, Wiley interscience, New York, 449 p.
- Link D.D., Walter P.J., Kingston H.M.** (1998) Development and validation of the new EPA microwave-assisted leach method 3051A. *Environmental Science and Technology* **32**: 3628-3632.
- Lombi E., Zhao F.J., Dunham S.J., McGrath S.P.** (2001) Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality* **30**: 1919-1926.
- Lopez-Sanchez J.F., Rubio R., Rauret G.** (1993) Comparison of two sequential extraction procedures for trace metal partitioning in sediments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **51**: 113-121.
- López A., Lázaro N., Priego J.M., Marqués A.M.** (2000) Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **24**: 146-151.
- Lopez M.L., Peralta-Videa J.R., Benitez T., Gardea-Torresdey J.L.** (2005) Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. *Chemosphere* **61**: 595-598.
- Lugtenberg B.J.J., Dekkers L.C.** (1999) What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent ? *Environmental Microbiology* **1**: 9-13.
- Ma J.F., Nomoto K.** (1996) Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiologia Plantarum* **97**: 609-617.
- MacNair M.R., Tilstone G.H., Susanne E.S.** (2000) The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Terry N., Bañuelos G. (eds). Boca Raton: Lewis Publishers 235-250.
- Maier R.M., Neilson J.W., Artiola J.F., Jordan F.L., Glenn E.P., Descher S.M.** (2001) Remediation of metal-contaminated soil and sludge using biosurfactant technology. *International Journal of Occidental Medicine and Environmental Health* **14**: 241-248.
- Malcova R., Vosatka M., Gryndler M.** (2003) Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaris* L. *Applied Soil Ecology* **23**: 55-67.
- Marschner H.** (1998) Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crops Research* **56**: 203-207.
- Marschner H., Romheld V., Kissel M.** (1987) Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots. *Physiologia Plantarum* **71**: 157-162.
- Marschner H., Dell B.** (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* **159**: 89-102.
- Marschner H., Römheld V.** (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* **165**: 261-274.
- Martinez-Villegas N., Flores-Velez L.M., Dominguez O.** (2004) Sorption of lead in soil as a function of pH: a study case in Mexico. *Chemosphere* **57**: 1537-1542.
- Masalha J., Kosegarten H., Elmaci Ö., Mengel K.** (2000) The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils* **30**: 433-439.
- May M., Vernoux T., Leaver C., Van Montagu M., Inze D.** (1998) Review article. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**: 649-667.
- McGrath S.P.** (1982) The uptake and translocation of tri- and hexa-valent chromium and effects in the growth of oat in flowing nutrient solution and in soil. *New Phytologist* **92**: 381-390.

- McGrath S.P., Chaudri A.M., Giller K.E.** (1995) Long-term effects of land application of sewage sludge: soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology* **14**: 94-104.
- McGrath S.P., Shen Z.G., Zhao F.J.** (1997) Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant and Soil* **188**: 153-159.
- McGrath S.P., Zhao F.J., Lombi E.** (2001) Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil* **232**: 207-214.
- McGrath S.P., Zhao J., Lombi E.** (2002) Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy*. **75**: 1-56.
- McGrath S.P., Zhao F.-J.** (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 277-282.
- McIntyre T.** (2003) Phytoremediation of heavy metals from soils. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, **78**: 97-123.
- McLaren, R.** (1998) Assessment of heavy metal contaminations of soils using sequential fractionations. In *16ème Congrès Mondial de Science du Sol*. 20-26 aout, Montpellier, **120** : 1-6.
- McLoughlin A.** (1994) Controlled release of immobilized cells as a strategy to regulate ecological competence of inocula. *Biotechnics/Wastewater* **51**: 1-45.
- Meagher R.B.** (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 153-162.
- Means J.L., Kucak T., Crerar D.A.** (1980) Relative degradation rates of NTA, EDTA and DTPA and environmental implications. *Environmental Pollution Series B* **1**: 45-60.
- Medina A., Vassileva M., Barea J.-M., Azcon R.** (2006) The growth-enhancement of clover by *Aspergillus*-treated sugar beet waste and *Glomus mosseae* inoculation in Zn contaminated soil. *Applied Soil Ecology* **33**: 87-98.
- Meers E., Ruttens A., Hopgood M., Lesage E., Tack F.M.G.** (2005) Potential of *Brassic rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils. *Chemosphere* **61**: 561-572.
- Mehra R.K., Kodati V.R., Abdullah R.** (1995) Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **215**: 730-736.
- Mei B., Puryear J.D., Newton R.J.** (2002) Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species. *Plant and Soil* **247**: 223-231.
- Mench M., Morel J.L., Guckert A.** (1987) Metal binding properties of high molecular weight soluble exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* **3**: 165-169.
- Mench M., Martin E.** (1991) Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. *Plant and Soil* **132**: 187-196.
- Mergeay M., Nies D., Schlegel H.G., Gerits J., Charles P., Van Gijsegem F.** (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology* **162**: 328-334.
- Meyer J.-M., Stintzi A., Poole K.** (1999) The ferripyoverdine receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 recognizes the ferripyoverdines of *P. aeruginosa* PAO1 and *P. fluorescens* ATCC 13525. *FEMS Microbiology Letters* **170**: 145-150.
- Meyer J.-M.** (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* **174**: 135-142.
- Michelin J., Bourgeois S., Wiart J., Bermond A.** (2002) Bilan dans un sol agricole à la suite d'apports réguliers de boues depuis 1985. In *Les éléments traces métalliques dans les sols. Approches spatiales fonctionnelles*. Baize D., Tercé M. (eds). Paris: INRA éditions, 155-167.

- Miller R.M.** (1995) Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environmental Health Perspectives* **103**: 59-62.
- Miller W.G., Leveau J.H.J., Lindow S.E.** (2000) Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1243-1250.
- Mills W.B., Liu S., Fong F.K.** (1991) Literature review and model (COMET) for colloid/metals transport in porous media. *Ground Water* **29**: 199-208.
- Minguzzi C., Vergnano O.** (1948) Il contenuto di nichel nelli ceneri di *Alyssum bertolonii* Desv. *Atti della Societa Toscana di Science Natirali*, Mem Ser A **55**: 49-77.
- Ministère de l'aménagement du territoire de l'environnement** (1996) *Principaux rejets industriels en France : bilan de l'année 1995*. Laigre J.F. (ed) Paris: Direction de la prévention des pollutions des risques, 206 p.
- Ministère de l'Ecologie** (2004) <http://basol.environnement.gouv.fr/accueil.php>
- Miquel, G.** (2001) Les effets des métaux lourds sur l'environnement la santé. Paris: Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques technologiques, 366 p.
- Mirleau P., Delorme S., Philippot L., Meyer J.-M., Mazurier S., Lemanceau P.** (2000) Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *FEMS Microbiology Ecology* **34**: 35-44.
- Mishra S., Singh V., Srivastava S., Srivastava R., Srivastava M.M., Dass S., Satsangi G.P., Prakash S.** (1995) Studies on uptake of trivalent and hexavalent chromium by maize (*Zea mays*). *Food and Chemical Toxicology* **33**: 393-397.
- Misra T.K.** (1992) Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* **27**: 4-16.
- Moenne-Loccoz Y., Naughton M., Higgins P., Powell J., O'Connor B., O'Gara F.** (1999) Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Applied Microbiology* **86**: 108-116.
- Monbouquette H.G., Ollis D.F.** (1988) Scanning microfluorimetry of Ca-alginate immobilized *Zymomonas Mobilis*. *Nature Biotechnology* **6**: 1076-1079.
- Morera M.T., Echeverria J.C., Mazkieran C., Garrido J.J.** (2001) Isotherms and sequential extraction procedures for evaluating sorption and distribution of heavy metals in soils. *Environmental Pollution* **113**: 135-144.
- MRA68** (1999) Les métaux lourds parlons-en! *Tabou(e) story* 13p.
- Mühlbachova G., Contin M., De Nobili M.** (2004) Coupled ICP-AES study of Pb and Zn complexation in long-term contaminated soils. *EUROSOIL* Freiburg, Germany: N°190.
- Mullen M.D., Wolf D.C., Ferris F.G., Beveridge T.J., Flemming C.A., Bailey G.W.** (1989) Bacterial sorption of heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 3143-3149.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F.** (1999a) Removal of heavy metals from contaminated soil and sediments using the biosurfactant surfactin. *Journal of Soil Contamination* **8**: 231-254.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F., James S., Bennett H.P.J.** (1999b) Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science and Technology* **33**: 3812-3820.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F.** (2001) Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* **60**: 193-207.
- Mulligan C.N., Yong, R.N.** (2004) Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International* **30**: 587-601.



- Nacamulli C., Bevivino A., Dalmastri C., Tabacchioni S., Chiarini L.** (1997) Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiology Ecology* **23**: 183-193.
- Nascimento C.W.A.d., Xing B.** (2006) Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia Agricola* **63**: 299-311.
- Neilands J.B.** (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biology and Chemistry* **270**: 26723-26726.
- Neubauer U., Nowack B., Furrer G., Schulin R.** (2000) Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore Desferrioxamine B. *Environmental Science and Technology* **34**: 2749-2755.
- Newcombe D.A., Crowley D.E.** (1999) Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine degrading bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 877-882.
- Nies D.H.** (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 730-750.
- Nriagu J., Becker C.** (2003) Volcanic emissions of mercury to the atmosphere: global and regional inventories. *The Science of The Total Environment* **304**: 3-12.
- O'Sullivan D.J., O'Gara F.** (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews* **56**: 662-676.
- Obroucheva N.V., Bystrova E.I., Ivanov V.B., Antipova O.V., Seregin I.V.** (1998) Root growth responses to lead in young maize seedlings. *Plant and Soil* **200**: 55-61.
- Ohtake H., Cervantes C., Silver S.** (1987) Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *Journal of Bacteriology* **169**: 3853-3856.
- Omar S.H.** (1993) Oxygen diffusion through gels employed for immobilization. *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**: 173-181.
- Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.W.** (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 4721-4728.
- Osborn A.M., Bruce K.D., Strike P., Ritchie D.A.** (1997) Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiology Reviews* **19**: 239-262.
- Ozdemir G., Ceyhan N., Manav E.** (2005) Utilization of an exopolysaccharide produced by *Chryseomonas luteola* TEM05 in alginate beads for adsorption of cadmium and cobalt ions. *Bioresource Technology* **96**: 1677-1682.
- Paff S.W., Bosilovich B.E.** (1995) Use of lead reclamation in secondary lead smelters for the remediation of lead contaminated sites. *Journal of Hazardous Materials* **40**: 139-164.
- Pandley A.K., Pandey S.D., Misra V.** (2002) Removal of toxic metals from leachates from hazardous solid wastes and reduction of toxicity to Microtox by the use of calcium alginate beads containing humic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **52**: 92-96.
- Papoulias F.** (2006) Contaminated mining sites : the new Mining Waste directive and the proposed Soil directive. Conférence Difpolmine, Ademe, Montpellier, 12-13 décembre
- Park J.G., Curtis L.R.** (1997) Mercury distribution in sediments and bioaccumulation by fish in two oregon reservoirs: point-source and nonpoint-source impacted systems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **33**: 423-429.
- Patel R.M., Desai A.J.** (1997) Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology* **25**: 91-94.
- Patra M., Bhowmik N., Bandopadhyay B., Sharma A.** (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **52**: 199-223.

- Payne S.M., Virginia L.C.a.P.M.B.** (1994) Detection, isolation, and characterization of siderophores. In *Methods in Enzymology*. Elsevier, San Diego CA, 235, 329-344.
- Pazurkiewicz-Kocot K., Galas W., Kita A.** (2003) The effect of selenium on the accumulation of some metals in *Zea mays* L. plants treated with indole-3-acetic acid. *Cellular & Molecular Biology Letters* **8**: 97-103.
- Peer W., Baxter I., Richards E., Freeman J., Murphy A.** (2006) Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*, 299-340.
- Peng H.Y., Tian S.K., Yang X.E.** (2005) Changes of root morphology and Pb uptake by two species of *Elsholtzia* under Pb toxicity. *Journal of Zhejiang University Science B* **6**: 546-552.
- Persson A., Molin G., Weibull C.** (1990) Physiological and morphological changes induced by nutrient limitation of *Pseudomonas fluorescens* 378 in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 686-692.
- Pichtel J., Kuroiwa K., Sawyerr H.T.** (2000) Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. *Environmental Pollution* **110**: 171-178.
- Pidello A.** (2003) The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production on the soil redox status. *Plant and Soil* **253**: 373-379.
- Piechalak A., Tomaszewska B., Baralkiewicz D., Malecka A.** (2002) Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* **60**: 153-162.
- Pierangeli M.A.P., Guilherme L.R.G., Curi N., Silva M.L.N., Oliveira L.R., Lima J.M.** (2001) Lead adsorption/desorption in Brazilian oxisols as a function of pH. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* **25**: 269-277.
- Pochon J., Tardieux P.** (1957) Techniques d'analyse en microbiologie du sol, Collection techniques de base, La Tourelle, 111p.
- Pointdexter J.S.** (1981) Oligotrophy. *Advances in Microbiology and Ecology* **5** : 63-89.
- Poole K., McKay G.A.** (2003) Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa* : many roads lead to Rome. *Frontiers in Bioscience*, **8**: 661-686.
- Postma J., Hok-A-Hin C.H., Oude Voshaar J.H.** (1990) Influence of the inoculum density on the growth and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into sterile and non-sterile loamy sand and silt loam. *FEMS Microbiology Letters* **73**: 49-57.
- Prince R.W., Cox C.D., Vasil M.L.** (1993) Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *Journal of Bacteriology* **175**: 2589-2598.
- Pulford I.D., Watson C.** (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees-a review. *Environment International* **29**: 529-540.
- Quartacci M.F., Argilla A., Baker A.J.M., Navari-Izzo F.** (2006) Phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by Indian mustard. *Chemosphere* **63**: 918-925.
- Rai U.N., Pandey K., Sinha S., Singh A., Saxena R., Gupta D.K.** (2004) Revegetating fly ash landfills with *Prosopis juliflora* L.: impact of different amendments and *Rhizobium* inoculation. *Environment International* **30**: 293-300.
- Rajkumar M., Nagendran R., Lee K.J., Lee W.H., Kim S.Z.** (2006) Influence of plant growth promoting bacteria and  $\text{Cr}^{6+}$  on the growth of Indian mustard. *Chemosphere* **62**: 741-748.
- Raksataya M., Langdon A.G., Kim N.D.** (1996) Assessment of the extent of lead redistribution during sequential extraction by two different methods. *Analytica Chimica Acta* **332**: 1-14.
- Ramadan M.A., el-Tayeb O.M., Alexander M.** (1990) Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Applied Environmental Microbiology* **56**: 1392-1396.

- Ranjard L., Richaume A., Jocteur-Monrozier L., Nazaret S.** (1997) Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiology Ecology* **24**: 321-331.
- Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S., Salt D.E.** (1994) Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* **5**: 285-290.
- Raskin I., Smith R.D., Salt D.E.** (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 221-226.
- Rasmussen L.D., Sorensen S.J., Turner R.R., Barkay T.** (2000) Application of a *mer-lux* biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 639-646.
- Rausser W.E.** (1995) Phytochelatins and related peptides (structure, biosynthesis, and function). *Plant Physiology* **109**: 1141-1149.
- Ravichandran M.** (2004) Interactions between mercury and dissolved organic matter--a review. *Chemosphere* **55**: 319-331.
- Recourt K., Schripsema J., Kijne J.W., Brussel A.A.N., Lugtenberg B.J.J.** (1991) Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavanones and chalcones. *Plant Molecular Biology* **16**: 841-852.
- Reed B.E., Carriere P.C., Moore R.** (1996) Flushing of a Pb(II) contaminated soil using HCl, EDTA, and CaCl<sub>2</sub>. *Journal of Environmental Engineering* **122**: 48-50.
- Reeves R.D., Brooks R.R.** (1983) Hyperaccumulation of lead and zinc by two metallophytes from mining areas of Central Europe. *Environmental Pollution Series A* **31**: 277-285.
- Reeves R.D., Baker A.J.M.** (2000) Metal-accumulating plants. In *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Raskin I., Ensley B.D. (eds). New York: John Wiley and Sons Inc., 193-229.
- Remy S., Prudent P., Hissler C., Probst J.L., Krempp G.** (2003) Total mercury concentrations in an industrialized catchment, the Thur River basin (north-eastern France): geochemical background level and contamination factors. *Chemosphere* **52**: 635-644.
- Ribeyre F., Boudou A.** (1994) Experimental study of inorganic and methylmercury bioaccumulation by four species of freshwater rooted macrophytes from water and sediment contamination sources. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **28**: 270-286.
- Ricoux C., Gasztowtt B.** (2005) Evaluation des risques sanitaires liés à l'exposition de forts consommateurs de produits de la pêche de rivière contaminés par des toxiques de l'environnement. Institut National de Veille Sanitaire, 65p.
- Roane T.M.** (1999) Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal-contaminated soils. *Microbial Ecology* **37**: 218-224.
- Robert M., Juste C.** (1998) Stocks flux d'éléments traces dans les sols du territoire In *Epanchage des boues d'épuration urbaines: aspects sanitaires environnementaux. Actes définitifs des journées techniques ADEME*. 5 et 6 juin 1997 Paris, 320p.
- Robinson B.H., Brooks R.R., Howes A.W., Kirkman J.H., Gregg P.E.H.** (1997a) The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. *Journal of Geochemical Exploration* **60**: 115-126.
- Robinson B.H., Chiarucci A., Brooks R.R., Petit D., Kirkman J.H., Gregg P.E.H., De Dominicis V.** (1997b) The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration* **59**: 75-86.
- Rodrigues J.L.M., Aiello M.R., Urbance J.W., Tsoi T.V., Tiedje J.M.** (2002) Use of both 16S rRNA and engineered functional genes with real-time PCR to quantify an engineered, PCB-degrading *Rhodococcus* in soil. *Journal of Microbiological Methods* **51**: 181-189.
- Rodriguez R., Vassilev N., Azcon R.** (1999) Increases in growth and nutrient uptake of alfalfa grown in soil amended with microbially-treated sugar beet waste. *Applied Soil Ecology* **11**: 9-15.

- Roehl K.E., Czurda K.** (1998) Diffusion and solid speciation of Cd and Pb in clay liners. *Applied Clay Science* **12**: 387-402.
- Romkens P., Bouwman L., Japenga J., Draaisma C.** (2002) Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environmental Pollution* **116**: 109-121.
- Ruby M.V., Schoof R., Brattin W., Goldade M., Post G., Harnois M., Mosby D.E., Casteel S.W., Berti W., Carpenter M., Edwards D., Cragin D., Chappell W.** (1999) Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science and Technology* **33**: 3697-3705.
- Rugh C.L., Wilde H.D., Stack N.M., Thompson D.M., Summers A.O., Meagher R.B.** (1996) Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 3182-3187.
- Ruley T.A., Sharma N.C., Sahi S.V.** (2004) Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 899-906.
- Russo A., Moëgne-Loccoz Y., Fedi S., Higgins P., Fenton A., Dowling D.N., O'Regan M., O'Gara F.** (1996) Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**: 740-745.
- Rutherford P.M., Juma N.G.** (1992) Influence of texture on habitable pore space and bacterial-protozoan populations in soil. *Biology and Fertility of Soils* **12**: 221-227.
- Sahi S.V., Bryant N.L., Sharma N.C., Singh S.R.** (2002) Characterization of a lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii*. *Environmental Science and Technology* **36**: 4676-4680.
- Salt D.E., Rauser W.E.** (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* **107**: 1293-1301.
- Salt D.E., Kramer U.** (2000) Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. In *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment*, Raskin I., Ensley B.D. (eds). New York: John Wiley & Sons, 231-246.
- Salt D.E., Blaylock M., Nanda Kumar P.B.A., 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.
- Sas-Nowosielska A., Kucharski R., Malkowski E., Pogrzeba M., Kuperberg J.M., Krynski K.** (2004) Phytoextraction crop disposal--an unsolved problem. *Environmental Pollution* **128**: 373-379.
- Sauve S., McBride M.B., Hendershot W.H.** (1997) Speciation of lead in contaminated soils. *Environmental Pollution* **98**: 149-155.
- Sauve S., Hendershot W., Allen H.E.** (2000) Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environmental Science and Technology* **34**: 1125-1131.
- Sayer J.A., Cotter-Howells J.D., Watson C., Hillier S., Gadd G.M.** (1999) Lead mineral transformation by fungi. *Current Biology* **9**: 691-694.
- Sayler G.S., Ripp S.** (2000) Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology* **11**: 286-289.
- Sayler G.S., Fleming J.T., Nivens D.E.** (2001) Gene expression monitoring in soils by mRNA analysis and gene *lux* fusions. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 455-460.
- Schmidt W.** (1996) Influence of chromium(III) on root-associated Fe(III) reductase in *Plantago lanceolata* L. *Journal of Experimental Botany* **47**: 805-810.
- Schwyn B., Neilands J.B.** (1987) Universal chemical assay for the detection and the determination of sidérophores. *Analytical Biochemistry* **160**: 47-56.
- Seaman J.C., Arey J.S., Bertsch P.M.** (2001) Immobilization of nickel and other metals in contaminated sediments by hydroxyapatite addition. *Journal of Environmental Quality* **30**: 460-469.

- Semple K.T., Doick K.J., Jones K.C., Burauel P., Craven A., Harms H.** (2004) Defining bioavailability and bioaccessibility for the risk assessment and remediation of soils and sediment is complicated. *Environmental Science and Technology* **38**: 228A-231A.
- Senoo K., Nishiyama M., Wada H., Matsumoto S.** (1992) Differences in dynamics between indigenous and inoculated *Sphingomonas paucimobilis* strain SS86 in soils. *FEMS Microbiology Letters* **86**: 311-319.
- Seong K.-Y., Hofte M., Boelens J., Verstraete W.** (1991) Growth, survival, and root colonization of plant growth beneficial *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 at different temperatures. *Soil Biology and Biochemistry* **23**: 423-428.
- Serp D., Cantana E., Heinzen C., Von Stockar U., Marison I.W.** (2000) Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* **70**: 41-53.
- Shahandeh H., Hossner L.** (2000) Plant screening for chromium phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **2**: 31-51.
- Shanker A.K., Djanaguiraman M., Sudhagar R., Chandrashekar C.N., Pathmanabhan G.** (2004) Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Science* **166**: 1035-1043.
- Sharma A., Johri B.N.** (2003a) Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiological Research* **158**: 243-248.
- Sharma A., Johri B.N.** (2003b) Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiological Research* **158**: 77-81.
- Sharma,P., Dubey R.S.** (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 35-52.
- Sharma S., Sundaram C.S., Luthra P.M., Singh Y., Sirdeshmukh R., Gade W.N.** (2006) Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *Journal of Biotechnology* **126**: 374-382.
- Shenker M., Fan T.W.M., Crowley D.E.** (2001) Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants. *Journal of Environmental Quality* **30**: 2091-2098.
- Shi W., Bischoff M., Turco R., Konopka A.** (2002) Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* **21**: 169-177.
- Shuman L.M.** (1985) Fractionation methods for soil microelements. *Soil Science* **140**: 11-22.
- Siegel B.Z., Lasconia M., Yaeger E., Siegel S.M.** (1984) The phytotoxicity of mercury vapor. *Water, Air, & Soil Pollution* **23**: 15-24.
- Singh O.V., Labana S., Pandey G., Budhiraja R., Jain R.K.** (2003) Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**: 405-412.
- Skeffington R.A., Shewry P.R., Peterson P.J.** (1976) Chromium uptake and transport in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **132**: 209-214.
- Smith J.A.C., Harper F.A., Leighton R.S., Thompson I.P., Vaughan D.J., Baker A.J.M.** (1999) Comparative analysis of metal uptake, transport and sequestration in hyperaccumulator plants. In *Proceedings of the 5th International Conference on the biogeochemistry of trace elements* Vienna, 22-23.
- Smith S., Peterson P.J., Kwan H.M., K.** (1989) Chromium accumulation, transport and toxicity in plants. *Toxicology and Environmental Chemistry* **24**: 241-251.
- Smith S.E., Reed D.J.,** (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press, 589p.
- Soberón-Chávez G., Lépine F., Déziel E.** (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**: 718-725.

- Sreeram K.J., Yamini Shrivastava H., Nair B.U.** (2004) Studies on the nature of interaction of iron(III) with alginates. *Biochimica Biophysica Acta - General Subjects* **1670**: 121-125.
- Srivastava S., Prakash S., Srivastava M.** (1999) Chromium mobilization and plant availability — the impact of organic complexing ligands. *Plant and Soil* **212**: 201-206.
- Stein E.D., Cohen Y., Winer A.M.** (1996) Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Critical Review in Environmental Science and Technology* **26**: 1-43.
- Stintzi A., Evans K., Meyer J.-M., Poole K.** (1998) Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: *lasR/lasI* mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* **166**: 341-345.
- Subhadra A.V., Panda K.K., Panda B.B.** (1993) Residual mercury in seed of barley (*Hordeum vulgare* L.) confers genotoxic adaptation to ethyl methanesulfonate, maleic hydrazide, methyl mercuric chloride and mercury-contaminated soil. *Mutation Research/Genetic Toxicology* **300**: 141-149.
- Sung-Chyr L.** (1996) Biosurfactants: Recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **66**: 109-120.
- Tack F.M.G., Verloo M.G.** (1995) Chemical speciation and fractionation in soil and sediment heavy metal analysis: a review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **59**: 225-238.
- Tal Y., van Rijn J., Nussinovitch A.** (1999) Improvement of mechanical and biological properties of freeze-dried denitrifying alginate beads by using starch as a filler and carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 773-779.
- Tamura H., Honda M., Sato T., Kamachi H.** (2005) Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Plant Research* **118**: 355-359.
- Tanaka H., Matsumura M., Veliky I.A.** (1984) Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* **26**: 53-58.
- Teitzel G.M., Parsek M.R.** (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2313-2320.
- Teitzel G.M., Geddie A., De Long S.K., Kirisits M.J., Whiteley M., Parsek M.R.** (2006) Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **188**: 7242-7256.
- Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M.** (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* **51**: 844-851.
- Tester M., Leigh R.A.** (2001) Partitioning of nutrient transport processes in roots. *Journal of Experimental Botany* **52**: 445-457.
- Tobin J.M., White C., Gadd G.M.** (1994) Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology* **13**: 126-130.
- Trevors J.T., van Elsas J.D., Lee H., van Overbeek L.S.** (1992) Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. *Microbial Releases* **1**: 61-69.
- Trevors J.T., Elsas J.D., Lee H., Wolters A.C.** (1993) Survival of alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**: 637-643.
- Tritter A.** (2004) Dépollution des sols agricoles chargés en éléments traces métalliques par phytoextraction accélérée. Rapport de stage de master 2, Colmar, 53p.
- Trouvé T.** (2006) Remediation des sols pollués. In *Colloque Biodépollution Environnement* Paris, 12-13 septembre 2006.
- Tung G., Temple P.J.** (1996) Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *Science of The Total Environment* **188**: 71-85.
- Turgut C., Pepe K. M., Cutright T.J.** (2004) The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution* **131**: 147-154.

- Turner, A.P.** (1994) The responses of plants to heavy metals. In *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*. Ross S.M. (ed). Chichester: John Wiley & Sons, 152-187.
- Ure A.M., Quevauviller P., Muntau H., Griepink B.** (1993) Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **51**: 135-151.
- Valix M., Usai F., Malik R.** (2001) Fungal bio-leaching of low grade laterite ores. *Minerals Engineering* **14**: 197-203.
- Van Aken B., Yoon J.M., Schnoor J.L.** (2004) Biodegradation of nitro-substituted explosives TNT, RDX and HMX by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 508-517.
- Van der Lelie D., Corbisier P., Diels L., Gilis A., Lodewyckx C., Mergeay M., Taghavi S., Spelmans N., Vangronsveld J.** (2000) The role of bacteria in the phytoremediation of heavy metals. In *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Terry N., Bañuelos G. (eds). Boca Raton: Lewis Publisher, 265-281.
- Van den Broek D., Chin-A-Woeng T.F.C., Eijkemans K., Mulders I.H.M., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J.** (2003) Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. *Molecular Plant Microbe Interaction* **16**: 1003-1012.
- Van Driel W., Smilde, K.W.** (1990) Micronutrients and heavy metals in Dutch agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **25**: 115-126.
- Van Dyke M.I., Prosser J.I.** (2000) Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1377-1382.
- Van Elsas J.D., Dijkstra A.F., Govaert J.M., van Veen J.A.** (1986) Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. *FEMS Microbiology Letters* **38**: 151-160.
- Van Elsas J.D., Heijnen C.E.** (1990) Methods for the introduction of bacteria into soil: A review. *Biology and Fertility of Soils* **10**: 127-133.
- Van Elsas J.D., Trevors J.T., Jain D., Wolters A.C., Heijnen C.E., Overbeek L.S.** (1992) Survival of, and root colonization by, alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells following introduction into soil. *Biology and Fertility of Soils* **14**: 14-22.
- Van Overbeek L.S., Eberl L., Givskov M., Molin S., van Elsas J.D.** (1995) Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 4202-4208.
- Van Overbeek L.S., van Elsas, J.D.** (1995) Root exudate-induced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 890-898.
- Van Ranst E., Verloo M., Demeyer A., Pauwels J.M.** (1999) Manual for the soil chemistry and fertility laboratory, Ghent University, Faculty Agricultural and Applied Biological Sciences, Gent, Belgium, 243 pp.
- Van Veen J.A., van Overbeek L.S., van Elsas J.D.** (1997) Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **61**: 121-135.
- Vassil A.D., Kapulnik Y., Raskin I., Salt D.E.** (1998) The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiology* **117**: 447-453.
- Vassilev N., Toro M., Vassileva M., Azcon R., Barea J.M.** (1997) Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. *Bioresource Technology* **61**: 29-32.
- Vazquez M.D., Poschenrieder C.H., Barcelo J.** (1987) Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annals of Botany* **59**: 427-438.

- Vilchez C., Garbayo I., Lobato M.V., Vega J.** (1997) Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme and Microbial Technology* **20**: 562-572.
- Visca P., Colotti G., Serino L., Verzili D., Orsi N., Chiancone E.** (1992) Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2886-2893.
- Visca P., Leoni L., Wilson M.J., Lamont I.L.** (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology* **45**: 1177-1190.
- Vivas A., Voros I., Biro B., Campos E., Barea J.M., Azcon R.** (2003) Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environmental Pollution* **126**: 179-189.
- Vogeli-Lange R., Wagner G.J.** (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves : implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiology* **92**: 1086-1093.
- Volesky B.** (1990) Biosorption of heavy metals, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 88 p.
- Volesky B., Holan Z.R.** (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress* **11**: 235-250.
- Wallschläger D., Desai M.V.M., Spengler M., Wilken R.-D.** (1998) Mercury speciation in floodplain soils and sediments along a contaminated river transect. *Journal of Environmental Quality* **27**: 1034-1044.
- Wang A.S., Angle J.S., Chaney R.L., Delorme T.A., McIntosh M.** (2006) Changes in soil biological activities under reduced soil pH during *Thlaspi caerulescens* phytoextraction. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 1451-1461.
- Wang F.Y., Lin X.G., Yin R.** (2007) Role of microbial inoculation and chitosan in phytoextraction of Cu, Zn, Pb and Cd by *Elsholtzia splendens* - a field case. *Environmental Pollution* **147**: 248-255.
- Wang Q.-R., Liu X.-M., Cui Y.-S., Dong Y.-T., Christie P.** (2002) Responses of legume and non-legume crop species to heavy metals in soils with multiple metal contamination. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **37**: 611-621.
- Wang W.-S., Shan X.-Q., Wen B., Zhang S.-Z.** (2003) Relationship between the extractable metals from soils and metals taken up by maize roots and shoots. *Chemosphere* **53**: 523-530.
- Wang Y., Brown H.N., Crowley D.E., Szaniszlo P.J.** (1993) Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant, Cell & Environment* **16**: 579-585.
- Wang Y.** (2004) Phytoremediation of mercury by terrestrial plants. Stockholm University, 41p.
- Wang Y., Greger, M.** (2004) Clonal differences in mercury tolerance, accumulation, and distribution in willow. *Journal of Environmental Quality* **33**: 1779-1785.
- Wasay S.A., Barrington S.F., Tokunaga S.F.** (1998) Using *Aspergillus niger* to bioremediate soils contaminated by heavy metals. *Bioremediation Journal* **2**: 183-190.
- Watanabe M.E.** (1997) Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environmental Science & Technology* **31**: 182A-186A.
- Weis J.S., Weis P.** (2004) Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environment International* **30**: 685-700.
- Weller D.M., Tomashow L.S.,** (1994) Molecular ecology of rhizosphere microorganisms, biotechnology and release of GMOs, In *Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere*, O'Gara F., Dowling D.N., Boesten B. (eds), Weinheim, Germany, VCH, 1-18.
- Wenger K., Gupta S.K., Furrer G., Schulin R.** (2003) The role of nitrilotriacetate in copper uptake by tobacco. *Journal of Environmental Quality* **32**: 1669-1676.



- Wenzel W.W., Bunkowski M., Puschenreiter M., Horak O.** (2003) Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution* **123**: 131-138.
- Whiteley M., Lee K.M., Greenberg E.P.** (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 13904-13909.
- Whiting S.N., de Souza M.P., Terry, N.** (2001a) Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Science and Technology* **35**: 3144-3150.
- Whiting S.N., Leake J.R., McGrath S.P., Baker A.J.** (2001b) Hyperaccumulation of Zn by *Thlaspi caerulescens* can ameliorate Zn toxicity in the rhizosphere of cocropped *Thlaspi arvense*. *Environmental Science and Technology* **35**: 3257-3241.
- WHO/FAO/IAEA** (1996) *Trace elements in human nutrition and health*. Geneva: World Health Organization, 155-160.
- Wild H.** (1974) Indigenous plants and chromium in Rhodesia. *Kiekie* **9**: 233-241.
- Wilkins D.A.** (1991) The influence of sheathing (ecto-)mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **35**: 245-260.
- Willaert R.G., Baron G.V.** (1996) Gel entrapment and micro-encapsulation : methods, applications and engineering principles, In : *Reviews in chemical engineering* , Amundson N.R., Luss D., Marmur A. (eds), Freund Publishing House, London, 12, 205 p.
- Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L.** (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica Biophysica Acta* **1465**: 104-126.
- Wittbrodt P.R., Palmer C.D.** (1995) Reduction of Cr(VI) in the presence of excess soil fulvic acid. *Environmental Science and Technology* **29**: 255-263.
- Wu J., Hsu F.C., Cunningham S.D.** (1999) Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints. *Environmental Science and Technology* **33**: 1898-1904.
- Wu L., Thompson D.K., Li G., Hurt R.A., Tiedje J.M., Zhou J.** (2001) Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5780-5790.
- Wu L.H., Luo Y.M., Xing X.R., Christie P.** (2004a) EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **102**: 307-318.
- Wu S.C., Cheung K.C., Luo Y.M., Wong M.H.** (2004b) Metal accumulation by *Brassica juncea* sharing rhizosphere with *Zea mays*: effect of mycorrhizal and beneficial bacterial inoculation. In: Proceedings of the fifth international conference on environmental geochemistry in the tropics, March 21-26, Haiko, Hainan, China, 72.
- Wu Q.T., Lui X.M., Meng Q.Q., Long X.X., Schwartz C., Morel J.L.** (2004c) Co-crop hyperaccumulator and low-accumulating plants for treating heavy metal contaminated soil and sludge, March 21-26, Haiko, Hainan, China, 71.
- Wu S.C., Cheung K.C., Luo Y.M., Wong M.H.** (2006) Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environmental Pollution* **140**: 124-135.
- Xian X.** (1989) Effect of chemical forms of cadmium, zinc, and lead in polluted soils on their uptake by cabbage plants. *Plant and Soil* **113**: 257-264.
- Xiangliang P., Jianlong W., Daoyong Z.** (2005) Biosorption of Pb(II) by *Pleurotus ostreatus* immobilized in calcium alginate gel. *Process Biochemistry* **40**: 2799-2803.
- Yang C.-H., Crowley D.E.** (2000) Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 345-351.

- Yardin M.R., Kennedy I.R., Thies J.E.** (2000) Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as bio-fertilisers and bio-pesticides. *Radiation Physics and Chemistry* **57**: 565-568.
- Yin Y., Allen H.E., Li Y., Huang C.P., Sanders P.F.** (1996) Adsorption of mercury(II) by soil: effects of pH, chloride, and organic matter. *Journal of Environmental Quality* **25**: 837-844.
- Yu G.Y., Wu Y.Y.** (1997) Effects of heavy metals joint action on their characteristic of sorption and desorption in brown soil. *Environmental Chemistry* **1**: 30-36.
- Zachara J.M., Girvin D.C., Schmidt R.L., Resch C.T.** (1987) Chromate adsorption on amorphous iron oxyhydroxide in the presence of major groundwater ions. *Environmental Science and Technology* **21**: 589-594.
- 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., Lytle C.M., Qian J.-H., Terry N.** (1998) Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta* **206**: 293-299.
- Zeza N., Pasini G., Lombardi A.** (1993) Production of a bacteriocin active on lactate fermenting clostridia by *Lactococcus lactis subsp. lactis* immobilized in calcium alginate beads. *Journal of Dairy Research* **60**: 581-591.
- Zhang F.S., Römheld V., Marschner H.** (1991) Diurnal rhythm of release of phytosiderophores and uptake rate of zinc in iron-deficient wheat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **37**: 671-678.
- Zhang Y., Miller R.M.** (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3276-3282.
- Zhang H., Zhao F.J., Sun B., Davison W., McGrath S.P.** (2001) A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science and Technology* **35**: 2602-2607.
- Zhao F.J., Hamon R.E., McLaughlin M.J.** (2001) Root exudates of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* do not enhance metal mobilization. *New Phytologist* **151**: 613-620.

## ANNEXE 1 : ANALYSES SOL A ET B

## Rapport d'Analyse de Terre

Edité le 29/07/2004

**SADEF Laboratoire**  
**68700 Aspach le Bas**  
 Téléphone 03 89 48 91 67  
 pole@sadef.fr / www.sadef.fr

Exploitation

Parcelle

Echantillon

Sol A

Feuille de rens. 917925 00  
 N° laboratoire T-03974-04  
 Prélevé le: 10/06/2004  
 Arrivé labo le: 07/07/2004  
 Délais d'analyse: 22 jours

## CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA PARCELLE

feuille 1/1

Epaisseur de prélèvement (cm) 30  
 Densité apparente estimée  
 Masse de sol (t/ha)  
 Cailloux (%) 0  
 Calcaire total (%) NF ISO 10693 0.0  
 Sol: 270 **LIMON SABLO ARGILEUX**

## Granulométrie (%) NF ISO 11277

Argile 17.9  
 Limons fins 19.7  
 Limons grossiers 14.6  
 Sables fins 14.2  
 Sables grossiers 27.2

Battance

Stabilité structurale Bartoli (1)  
 Capacité de rétention (pF 2.8) (1)  
 Point de flétrissement (pF 4.2) (1)

5 fractions (CaCO3 non détruit) +M.O.+ humidité résiduelle=100

## Matière organique (1) g/kg

(Carbone organique x 1.73)

Azote total g/kg

C/N

pH eau

pH KCl

CEC Metson (pH 7) mé/kg

Taux de saturation %

Teneur du sol	Niveau de référence	Très faible	Faible	Un peu faible	N	Satisfaisant	Elevé	méthode	
44.6	20	[Barre de 0 à 20]							ISO 14235
2.78		[Barre de 0 à 2.78]							ISO 13878
9.3	10.0	[Barre de 0 à 10]							NF ISO 10390
7.2	6.5	[Barre de 0 à 6.5]							NF ISO 10390
156		[Barre de 0 à 156]							NF X 31-130
Saturé		[Barre de 0 à 100]							

## FERTILITE CHIMIQUE

## Phosphore assimilable

Jorêt-Hébert (P2O5)

## Cations échangeables

Potassium (K2O)

Magnésium (MgO)

Calcium (CaO)

Sodium (Na2O)

## Oligo-éléments

Fer (Fe) DTPA

Manganèse (Mn) DTPA

Cuivre (Cu) DTPA

Zinc (Zn) DTPA

Bore (B)(1) Eau chaude

Molybdène Grigg (Mo) (1)

Teneur du sol	Niveau de référence	Très faible	Faible	Un peu faible	N	Satisfaisant	Elevé	méthode	
0.49	0.16	[Barre de 0 à 0.16]							NF X 31-161
3.0	0.14	[Barre de 0 à 0.14]							NF X 31-108
6.4	0.13	[Barre de 0 à 0.13]							NF X 31-121
175	4.89	[Barre de 0 à 4.89]							NF X 31-121
1.5	0.05	[Barre de 0 à 0.05]							NF X 31-121
		[Barre de 0 à 100]							NF X 31-122

MEMBRE DU GEMAS

## AUTRES DETERMINATIONS

Carbone organique g/kg(1) 25.8

ACCREDITATION  
 N° 1-0751  
 portée communiquée  
 sur demande

**J.-Y. BALITEAU**  
 Chef de Laboratoire

Le responsable  
 du laboratoire

Ce rapport d'essai ne concerne que les objets soumis à l'essai. L'accréditation de la section Laboratoires du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation. Ce rapport ne doit pas être reproduit sans l'approbation du laboratoire d'essai. La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous sa forme intégrale.  
 (1) Essais non couverts par l'accréditation. (2) Essais sous-traités. Résultats exprimés par rapport à la masse de terre fine sèche à 2 mm. L'interprétation est hors champs d'accréditation

## ANNEXE 1 (SUITE)

## Rapport d'Analyse de Terre

Edité le 02/02/2004



SADEF Laboratoire  
68700 Aspach le Bas  
Téléphone 03 89 48 91 67  
pole@sadef.fr / www.sadef.fr

Exploitation

Parcelle

Echantillon

Sol B

Feuille de rens. 917919 00  
N° laboratoire T-00125-04  
Prélevé le: 09/01/2004  
Arrivé labo le: 14/01/2004  
Délais d'analyse: 19 jours

## CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA PARCELLE

feuille 1/1

Epaisseur de prélèvement (cm) 30  
Densité apparente estimée  
Masse de sol (t/ha)  
Cailloux (%) 0  
Calcaire total (%) NF ISO 10693 0.0  
Sol: 270 **LIMON ARGILO SABLEUX**

## Granulométrie (%) NF ISO 11277

Argile 25.2  
Limons fins 29.6  
Limons grossiers 10.5  
Sables fins 8.0  
Sables grossiers 17.5

## Battance

Stabilité structurale Bartoli <sup>(1)</sup>  
Capacité de rétention (pF 2.8) <sup>(1)</sup>  
Point de flétrissement (pF 4.2) <sup>(1)</sup>

5 fractions (CaCO<sub>3</sub> non détruit) +M.O.+ humidité résiduelle=100Matière organique <sup>(1)</sup> g/kg

(Carbone organique x 1.73)

Azote total g/kg

C/N

pH eau

pH KCl

CEC Metson (pH 7) mé/kg

Taux de saturation %

Teneur du sol	Niveau de référence	Très faible	Faible	Un peu faible	N	Satisfaisant	Elevé	méthode	
63.7	20	[Barre de mesure]							ISO 14235
3.67		[Barre de mesure]							ISO 13878
10.0	10.0	[Barre de mesure]							NF ISO 10390
6.4	6.5	[Barre de mesure]							NF ISO 10390
214		[Barre de mesure]							NF X 31-130
78		[Barre de mesure]							

## FERTILITE CHIMIQUE

## Phosphore assimilable

Dyer (P2O5)

## Cations échangeables

Potassium (K2O)

Magnésium (MgO)

Calcium (CaO)

Sodium (Na2O)

## Oligo-éléments

Fer (Fe)

Manganèse (Mn)

Cuivre (Cu)

Zinc (Zn)

Bore (B)<sup>(1)</sup>Molybdène Grigg (Mo) <sup>(1)</sup>

Teneur du sol	Niveau de référence	Très faible	Faible	Un peu faible	N	Satisfaisant	Elevé		
g/kg	g/kg	[Barre de mesure]							NF X 31-160
0.20	0.25	[Barre de mesure]							
mé/kg	g/kg	[Barre de mesure]							NF X 31-108
7.4	0.35	[Barre de mesure]							
7.4	0.15	[Barre de mesure]							
149	4.18	[Barre de mesure]							
2.5	0.08	[Barre de mesure]							
mg/kg	mg/kg	[Barre de mesure]							NF X 31-121
		[Barre de mesure]							NF X 31-121
		[Barre de mesure]							NF X 31-121
		[Barre de mesure]							NF X 31-121
		[Barre de mesure]							NF X 31-121

## AUTRES DETERMINATIONS

Carbone organique g/kg<sup>(1)</sup> 36.8

MEMBRE DU GEMAS



ESSAIS  
ACCREDITATION  
N° 1-0751  
portée communiquée  
sur demande

J.-Y. BALITEAU  
Chef de Laboratoire

Le responsable  
du laboratoire

Ce rapport d'essai ne concerne que les objets soumis à l'essai. L'accréditation de la section Laboratoires du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation. Ce rapport ne doit pas être reproduit sans l'approbation du laboratoire d'essai. La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

(1) Essais non couverts par l'accréditation. (2) Essais sous-traités. Résultats exprimés par rapport à la masse de terre fine sèche à 2 mm. L'interprétation est hors champs d'accréditation

## ANNEXE 2 : MILIEUX DE CULTURE ET TAMPONS

### Milieu LB (Luria Bertani Broth)

Tryptone .....	10 g
Extrait de levure .....	5 g
NaCl .....	5 g
Eau distillée qsp .....	1 L

**Milieu LBA** : milieu LB avec 20g/L d'agar

### Milieu ME (Malt Extract, formule de Blakeslee)

Malt extract.....	20 g
Glucose.....	20 g
Peptone.....	1 g
Agar.....	20 g
Eau distillée qsp.....	1 L
pH 6,0	

### Milieu MSVG (Teitzel et Parsek, 2003)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1,00 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	0,06 g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,06 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,02 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,03 g
PIPES .....	2,969 g
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,003 g
Glucose.....	1,01 g
Eau distillée qsp.....	1 L
pH 6,5	

### Milieu Casamino acid (CAA)

Casamino acids (Difco).....	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,18 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	0,25 g
Eau distillée qsp.....	1 L
pH 7,0	

### Milieu sucrose tryptone ST (Cunningham et Kuiack, 1992)

Sucrose .....	20 g
Tryptone .....	5 g
Solution éléments traces .....	1 mL
Eau distillée qsp .....	1 L
pH 6,0	

#### Solution en éléments traces

HBO <sub>3</sub> .....	300 mg
ZnCl <sub>2</sub> .....	50 mg
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O .....	30 mg
CoCl <sub>2</sub> .....	200 mg
CuCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O .....	10 mg
NiCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O .....	20 mg
NaMo <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O .....	30 mg
Eau distillée qsp .....	1 L

**Milieu Minimum (MM)**

L-asparagine .....	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
FeCl <sub>3</sub> ,6H <sub>2</sub> O.....	0,02 g
Eau distillée qsp .....	1 L
pH 7,0 (ajusté avec HNO <sub>3</sub> 1,4M)	

**Milieu TSB (tryptic soy broth)**

Tryptone .....	17,0 g
Soytone/peptone .....	3,0 g
Glucose .....	2,5 g
NaCl .....	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,5 g
Eau distillée qsp .....	1 L

**Solution de Hoagland (Hoagland et Arnon, 1938)**

KNO <sub>3</sub> .....	0,606 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O .....	0,656 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,136 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O .....	0,241 g
Fe-citrate.....	20 mL
Solution éléments trace .....	10 mL
Eau distillée qsp .....	1 L
pH 6,0 (ajusté avec Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10 g/L)	

**Solution éléments traces**

MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O .....	181 mg
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O .....	22 mg
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O .....	8 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	286 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O .....	25 mg
Eau distillée qsp .....	1 L

**Solution de Fe-citrate**

Fe-citrate.....	0,548 g
Eau distillée qsp .....	250 mL

**Phosphate saline buffer (PBS)**

NaCl .....	8,00 g
KCl .....	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,20 g
CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O .....	0,13 g
MgCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O .....	0,10 g
pH 7,2	

**ANNEXE 3** : Matrice de corrélation des coefficients de Pearson. Les valeurs en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$ . **MI** : microorganismes inoculés, **MHT** : microorganismes hétérotrophe totaux, **sol** : microorganismes du sol non rhizosphérique, **rhizo** : microorganismes du sol rhizosphérique.

	pH	Eh	Biomasse feuilles	Biomasse racines	[Pb] feuilles	[Cr] feuilles	[Hg] racines	[Pb] racines	[Cr] racines	MI sol	MI rhizo	MHT sol	MHT rhizo	CrF1	CrF2	PbF1	PbF2
pH	1																
Eh	<b>-0,583</b>	1															
Biomasse feuilles	<b>-0,430</b>	<b>0,374</b>	1														
Biomasse racines	-0,103	0,126	<b>0,446</b>	1													
[Pb] feuilles	-0,167	<b>0,310</b>	-0,187	-0,223	1												
[Cr] feuilles	-0,044	0,157	-0,173	-0,251	<b>0,689</b>	1											
[Hg] racines	-0,135	0,095	-0,259	-0,117	<b>0,365</b>	<b>0,388</b>	1										
[Pb] racines	0,199	<b>-0,329</b>	0,008	0,201	-0,154	<b>-0,316</b>	-0,107	1									
[Cr] racines	0,214	<b>-0,298</b>	-0,027	0,224	-0,140	<b>-0,351</b>	-0,198	<b>0,769</b>	1								
MI sol	<b>-0,737</b>	<b>0,532</b>	<b>0,491</b>	0,062	0,171	0,174	-0,013	<b>-0,330</b>	<b>-0,363</b>	1							
MI rhizo	<b>-0,341</b>	<b>0,299</b>	-0,005	-0,037	0,104	0,148	<b>0,611</b>	-0,100	-0,170	<b>0,311</b>	1						
MHT sol	<b>-0,617</b>	<b>0,331</b>	<b>0,440</b>	0,255	-0,050	0,006	0,196	0,036	-0,021	<b>0,593</b>	<b>0,294</b>	1					
MHT rhizo	0,103	-0,135	-0,149	-0,034	0,101	0,267	<b>0,474</b>	0,140	0,000	-0,180	0,124	-0,035	1				
CrF1	0,059	<b>-0,326</b>	0,044	<b>0,286</b>	<b>-0,344</b>	<b>-0,413</b>	0,096	<b>0,620</b>	<b>0,501</b>	<b>-0,304</b>	0,206	0,041	<b>0,293</b>	1			
CrF2	0,271	-0,212	<b>-0,404</b>	-0,219	0,106	<b>0,318</b>	<b>0,375</b>	-0,045	-0,041	-0,242	0,019	-0,092	<b>0,404</b>	-0,254	1		
PbF1	-0,263	<b>0,485</b>	0,119	-0,206	<b>0,424</b>	<b>0,414</b>	-0,148	<b>-0,621</b>	<b>-0,540</b>	<b>0,594</b>	-0,055	0,009	<b>-0,357</b>	<b>-0,870</b>	-0,037	1	
PbF2	0,154	<b>-0,460</b>	-0,269	-0,144	-0,243	-0,028	<b>0,287</b>	0,181	0,166	<b>-0,475</b>	-0,098	0,074	<b>0,433</b>	0,254	<b>0,609</b>	<b>-0,589</b>	1

## TABLE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

**ADEME** : Agence de L'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

**AMF** : Arbuscular Mycorrhizal Fungi, champignon mycorhizien arbusculaire

**ASPITET** : Apports d'une Stratification Pédologique pour l'Interprétation des Teneurs en Eléments Traces

**ATCC** : American Type Collection Culture

**BASIAS** : Base de données des anciens sites industriels et activités de service

**BASOL** : Base de données des sites et sols pollués

**BRGM** : Bureau de Recherche Géologique et Minière

**BS** : Billes seules

**BTEX** : Benzène, toluène, xylène

**CAS** : Chrome Azurol S

**CBS** : CentraalBureau voor Schimmelcultures

**CEC** : Capacité d'Echange Cationique

**CET** : Centre d'enfouissement technique

**CI** : Cellules immobilisées

**CL** : Cellules libres

**CMC** : Concentration micellaire critique

**COV** : Composés organiques volatils

**Da** : Daltons

**DO** : Densité Optique

**DSM** : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

**DTPA** : Acide Diethylenetriaminepentaacétique

**EDDS** : Acide ethylenediamine-disuccinique

**EDTA** : Acide Ethylenediaminetetraacétique

**EGDA** : Ethylene glycol diacetate

**EPA** : Environmental Protection Agency

**EPS** : Exoploysaccharides

**EUP** : Eau Ultra Pure

**FB** : Facteur de Bioaccumulation

**FT** : Facteur de Translocation

**Gm** : Gentamycine

**HAP** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

**HEDTA** : acide hydroxy-2-éthylène diamino triacétique

**ICP-AES** : Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy



**INRA** : Institut National pour la Recherche Agronomique  
**Km** : Kanamycine  
**Lec** : lait-écrémé  
**MGDA** : acide methylglycinediacétique  
**MS** : Matière Sèche  
**MT** : Métaux Toxiques  
**NTA** : Acide nitriloacétique  
**PCB** : Polychloro biphényles  
**Pch** : Pyochéline  
**PCR** : Polymerase chain reaction  
**PF** : *Pseudomonas fluorescens*  
**PGPR** : Plant growth promoting rhizobacteria  
**PP** : Polypropylène  
**Pvd** : Pyoverdine  
**Rif** : Rifampicine  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**RT-PCR** : Reverse transcriptase polymerase chain reaction  
**SADEF** : Société Alsacienne pour le Développement et l'Etude des Fertilisants  
**STEP** : STation d'Épuration  
**TIE** : Taille d'inoculum élevée  
**TIF** : Taille d'inoculum Faible  
**Tpm** : Tour par minute  
**UE** : Union Européenne  
**WHO** : World Health Organization, Organisation Mondiale pour la Santé

# GLOSSAIRE

**Bioaugmentation** : inoculation d'un sol avec des microorganismes exogènes

**Capacité au champ** : définit la capacité de rétention maximale en eau du sol. Elle correspond à la quantité d'eau retenue après 48h d'égouttement d'eau libre vers la nappe phréatique, par un sol préalablement gorgé d'eau.

**Effet PGPR** : stimulation de la croissance d'un végétal hôte associé aux microorganismes rhizosphériques. Ces derniers agissent soit directement en sécrétant des phytohormones ou autres métabolites microbiens accroissant la disponibilité des nutriments pour la plante, soit indirectement en tant qu'agent de biocontrôle et/ou en déclenchant les mécanismes de résistance systémique induite chez la plante.

**Endorhizosphère** : espace intercellulaire entre les tissus de la racine habité par des bactéries qui ne forment pas de structures symbiotiques.

**Facteur de bioaccumulation (FB)** : désigne le ratio de la concentration en métal dans la plante sur la concentration en métal du sol. Ce ratio détermine la capacité d'accumulation ou d'hyperaccumulation de la plante.

**Facteur de translocation (FT)** : désigne le ratio de la concentration en métal dans les feuilles d'une plante sur la concentration en métal dans ses racines.

**Fraction métallique bioaccessible** : fraction accessible aux organismes biologiques à plus ou moins long terme.

**Fraction métallique biodisponible** : fraction capable de franchir la membrane cellulaire des organismes biologiques et d'interagir avec cet organisme.

**Quorum sensing** : mécanisme de régulation dépendant de la densité cellulaire, de l'expression de gènes spécifiques en réponse aux signaux chimiques extracellulaires produits par les bactéries.

**Rhizoplan** : surface de la racine

**Sidérotype** : groupe de bactéries ayant le même profil de migration lors du sidérotypage (séparation) de leurs sidérophores par isoélectrofocalisation.

**Stèle** : Ensemble des tissus conducteurs primaires occupant la partie centrale d'un organe.

**Trichome** : (du grec *thricos*, poils) : cellules polyploïdes spécialisées de l'épiderme des plantes supérieures. Ces cellules de grande taille forment normalement trois branches.

**Voie apoplastique** : voie de diffusion passive des éléments dans les végétaux par les espaces intracellulaires.

**Voie symplastique** : voie de diffusion active des éléments dans la plante par transport à travers les membranes cellulaires.

# VALORISATION SCIENTIFIQUE

## Articles dans des journaux internationaux à comité de lecture

Braud A., Jézéquel K., Vieille E., Tritter A., Lebeau T., **2006**, Cr and Pb bioavailability from a polycontaminated soil using bioaugmentation with microbial producers of biosurfactants, organic acids and siderophores. *Water Air and Soil Pollution: Focus*, 6, 261-279.

Braud A., Jézéquel K., Léger M.A., Lebeau T., **2006**, Siderophore production by using free and immobilized cells of two Pseudomonads cultivated in a medium enriched with Fe and/or toxic metals (Cr, Hg, Pb), *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 1080-1088.

Braud A., Jézéquel K., Lebeau T., **2007**, Impact of substrates and cell immobilization on siderophore activity by Pseudomonads in a Fe and/or Cr, Hg, Pb containing-medium, *Journal of Hazardous Materials*, 144, 229-239.

## Participation aux congrès

Braud A., Jézéquel K., Vieille E., Tritter A., Lebeau T., **2004**, Selection of microorganisms to enhance phytoextraction coupled together with bioaugmentation of soils poly-contaminated with Cr, Hg and Pb, *2<sup>nd</sup> Eurosoil Congress*, Freiburg, Germany, 04-12 september (**communication orale**).

Braud A., Jézéquel K., Lebeau T., **2005**, Synthesis of siderophores by free and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* for the bioaugmentation of an agricultural soil polycontaminated with toxic metals, *International Workshop on Fate and Impact of Persistent Pollutants in Agroecosystems*, Pulawy, Poland, 10-12 March 2005 (**affiche**).

Lebeau T., Braud A., Jézéquel K., **2005**, Phytoextraction accélérée par bioaugmentation de sols agricoles polycontaminés par du Cr, Hg, Pb, Journées ACI « Non Pollution – Dépollution », Paris, 19-20 décembre 2005 (**affiche**).

Braud A., Jézéquel K., Lebeau T., **2006**, Phytoextraction accélérée par bioaugmentation d'un sol agricole polycontaminé par Cr, Hg et Pb, *Journée de l'école doctorale*, Université de Haute-Alsace, Mulhouse, 8 juin 2006 (**affiche**).

Braud A., Jézéquel K., Lebeau T., **2006**, Phytoextraction améliorée par bioaugmentation d'un sol agricole polycontaminé par du chrome, du mercure et du plomb, *Les Métaux et le Vivant : Aspects chimiques et Biologiques*, Symposium ESBS, Strasbourg, 7 décembre 2006 (**communication orale**).

Braud A., Jézéquel K., Bazot S., Lebeau T., **2006**, Enhanced phytoextraction of chromium and lead in an agricultural soil coupled with bioaugmentation, Quel devenir pour les grands sites pollués par les métaux ? Conférence *Difpolmine*, ADEME, Montpellier, 12-14 décembre 2006 (**affiche**).



## Procédé de phytoextraction couplé à la bioaugmentation d'un sol agricole polycontaminé par du chrome, du mercure et du plomb

Les sols agricoles sont depuis de nombreuses années contaminés directement par apports d'intrants (pesticides, fertilisants) mais également de façon indirecte en raison de la proximité de certaines installations industrielles. Notre étude porte sur des sols agricoles à l'aval de la vallée de la Thur (Haut-Rhin), polycontaminés par du chrome (488 mg/kg), du mercure (13 mg/kg) et du plomb (381 mg/kg). La phytoextraction est une méthode innovante, employée pour ses propriétés respectueuses de la vie biologique du sol et son faible coût. La faible disponibilité des métaux dans le sol (notamment Cr, Hg et Pb), et par conséquent le temps de décontamination, constitue la principale limite de cette technique. La bioaugmentation couplée à la phytoremédiation (rhizoremédiation) est une technique récente qui a été testée pour cette étude de façon à accroître la vitesse de phytoextraction.

Les résultats ont montré que les microorganismes producteurs de sidérophores, notamment les *Pseudomonas*, étaient potentiellement intéressants pour augmenter la mobilité du chrome et du plomb dans le sol. La production de sidérophores par des cellules libres ou immobilisées de *Pseudomonas* cultivées en présence de divers substrats carbonés a été optimisée. L'immobilisation des microorganismes dans des billes d'alginate de calcium enrichies en lait écrémé a montré que les microorganismes étudiés produisaient plus de sidérophores en présence de métaux et que leur survie dans le sol était accrue. Les billes de Ca-alginate adsorbent plus de 90% de Cr, Fe et Pb ainsi que plus de 40% de Hg, ce qui diminue la toxicité métallique pour les cellules libres ou immobilisées, et crée également un déficit en Fe dans les billes, stimulant ainsi la production de sidérophores par les microorganismes. Les microorganismes sélectionnés ont ensuite été inoculés dans le sol contaminé, cultivé avec du maïs comme plante modèle. La bioaugmentation des pots de sol avec *Pseudomonas aeruginosa* co-immobilisé dans des billes de Ca-alginate avec du lait écrémé a permis de multiplier le prélèvement de Cr par les feuilles de maïs par 5,4 et celui du Pb par 3,8 par rapport aux pots non bioaugmentés. L'inoculation du sol enrichi en lait écrémé avec des cellules libres de *R. metallidurans* a permis d'augmenter le prélèvement foliaire de Cr par 5,2.

**Mots clés** : phytoextraction, bioaugmentation, cellules immobilisées, maïs, sidérophores, métaux (Cr, Pb, Hg)

## Phytoextraction process coupled with the bioaugmentation of a multi-contaminated agricultural soil, containing chromium, mercury and lead

Agricultural soils have been contaminated for many years by both direct pesticides and fertilizer supplies, and indirect contaminations originated from industrial activities. The agricultural soil used in the present study was collected in the Thur valley (Haut-Rhin, France), and contains chromium (488 mg/kg), mercury (13 mg/kg) and lead (381 mg/kg). Phytoextraction is a soft-cleaning technology, cost-effective and non-destructive for biological life in soil. Nevertheless the low availability of metals in soil along with the slowness of the phytoextraction process represent limiting factors that are likely to reduce its efficiency. A new technology named rhizoremediation, which associate bioaugmentation and phytoremediation, was tested in this study in order to enhance the phytoextraction rate.

Our results showed that Cr and Pb availability in soil was enhanced, as the result of the bioaugmentation of soil with microorganisms producing siderophores, especially with the *Pseudomonas* species. The siderophore production with *Pseudomonas* species was optimized with the addition of carbon substrates. Immobilization of bacterial cells in Ca-alginate beads supplied with skim milk enhanced the siderophore production in a metal-containing media and improved the bacterial survival in soil. More than 90% of Cr, Fe and Pb and more than 40% of Hg were adsorbed onto Ca-alginate beads surface, which decrease metal toxicity for immobilized or free cells, and create an iron deficiency inside the beads, which enhanced siderophores production by microorganisms. The selected microorganisms were inoculated in the contaminated soil, with maize as a model plant. The bioaugmentation of soil pots with immobilized cells of *P. aeruginosa* and skim milk enhanced the amount of metal accumulated in leaves by a factor of 5.4 and 3.8 for Cr and Pb respectively compared to non-bioaugmented pots. Soil bioaugmentation with free cells of *R. metallidurans* supplied with skim milk enhanced Cr extraction by leaves by a factor of 5.2.

**Keywords** : phytoextraction, bioaugmentation, immobilized cells, maize, siderophores, metals (Cr, Pb, Hg)