

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE



Année Académique

2021-2022

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

BIORESSOURCES ET AGRONOMIE

Option : Amélioration des Ressources Agricoles

TOGBA Kakou Didier

THEME:

Isolement et caractérisation phénotypique de la microflore des racines issues du site d'orpaillage de Kokumbo (Centre de la Côte d'Ivoire)

Soutenu, le 04 juillet 2022

JURY :

M. BAKAYOKO Sidiky, Professeur Titulaire, UJLoG, Président

M. KONATE Ibrahim, Professeur Titulaire, UJLoG, Directeur Scientifique

M. KOUASSI Kra Athanase, Maître-Assistant, UJLoG, Encadreur

M. COULIBALY Ibourahema, Maître de Conférences, UJLoG, Examineur

Table des matières

	Pages
TABLE DES MATIERES	i
DEDICACE.....	iv
REMERCIEMENTS	v
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	iv
INTRODUCTION.....	1
Première partie: Généralités	
1- ORPAILLAGE OU EXPLOITATION MINIERE ARTISANALE DE L'OR.....	3
1-1- Définition	3
1-2- Impacts positifs de l'orpaillage	3
1-3- Impacts négatifs de l'orpaillage.....	3
1-3-1- Impacts sur les ressources naturelles et l'environnement	3
1-3-2- Problèmes sociaux.....	4
2- LA RHIZOSPHERE	4
2-1- Définition.....	4
2-2- Microorganismes rhizosphériques	5
2-3- Diversité des microorganismes rhizosphériques	5
2-4- Propriétés et valorisations des microorganismes rhizosphériques.....	6
2-5- Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).....	6
3- QUELQUES MICROORGANISMES RETROUVES SUR LES RACINES ET NODULES	7
3-1- <i>Clostridium</i>	7
3-2- <i>Bacillus</i>	7
3-3- <i>Pseudomonas</i>	8
3-4- <i>Escherichia coli</i>	8
3-5- <i>Rhizobium</i>	8
3-6- <i>Staphylococcus aureus</i>	8
4- NODULATION	8
4-1- Définition.....	8
4-2- Processus de nodulation.....	9
5- BIOREMEDIATION	9
5-1- Définition de bioremédiation.....	9

5-2- Quelques techniques de la bioremédiation	10
5-2-1- Bioremédiation intrinsèque ou bioatténuation	10
5-2-2- Biostimulation	10
5-2-3- Bioaugmentation	10
5-2-4- Bioinjection	10
5-2-5- Bioextraction	10
Deuxième partie: Matériel et méthodes	
1- DESCRIPTION DE LA ZONE D'ÉTUDE	11
2- MATERIEL	11
2-1- Matériel biologique.....	11
2-2- Matériel technique	12
2-2-1- Appareillage	12
2-2-2- Consommable.....	12
2-2-3- Milieux de culture	12
3- METHODES	13
3-1- Échantillonnage des racines.....	13
3-1-1- Choix et site d'échantillonnage	13
3-1-2- Taille et repartition des échantillons	13
3-1-3- Prélèvement et transport des racines	13
3-1-4- Collecte, transport et conservation des nodules	13
3-2- Technique analyses microbiologiques.....	14
3-2-1- Préparation des milieux de culture	14
3-2-2- Préparation de la suspension mère	14
3-2-3- Ensemencement et incubation	14
3-2-4- Isolement des souches à partir des racines	14
3-2-5- Protocole d'isolement des souches à partir des nodules	15
3-3- Caractérisation phénotypique des souches	15
3-3-1- Caractérisation macroscopique.....	15
3-3-2- Caractérisation microscopique des souches par la coloration de Gram	15
3-3-3- Caractérisation biochimique.....	16
3-3-3-1- Test d'oxydase	16
3-3-3-2- Test de catalase	16
3-3-3-3- Test à la Lecithinase.....	16

3-3-4- Identification biochimique de quelques isolats des racines et présumés <i>E.Coli</i> à l'aide du portoir réduit de Leminor	16
3-3-4-1- Mise en évidence de l'uréase	16
3-3-4-2- Mise en évidence de la production d'indole	15
3-3-4-3- Fermentation des sucres sur le milieu Kligler Hajna	15
3-3-4-4- Test de mobilité sur le milieu Mannitol mobilité nitrate	15
3-3-4-5- Test à Lysine Fer.....	17
3-3-4-6- Utilisation du citrate comme seule source de carbone.....	15
1- RESULTATS	19
1-1- Caractérisation macroscopique des souches.....	19
1-1-1- Caractérisation macroscopique des souches isolées des racines	19
1-1-2- Caractérisation macroscopique des souches de Rhizobium isolées des racines	21
1-2- Caractérisation microscopique et biochimique des souches.....	21
1-2-1- Caractérisation microscopique et biochimique des souches isolées des racines.....	21
1-2-2- Caractérisation microscopique des souches isolées des nodules.....	23
1-2-3- Caractérisation biochimique des isolats présomptifs de <i>E.coli</i> extraits des racines	23
1-2-4- Prévalence des isolats identifiés par le portoir réduit de Leminor	25
2- DISCUSSION	26
CONCLUSION ET PERPECTIVES	29
REFERENCES.....	30

DEDICACE

*Je dédie ce mémoire à toute ma famille.
Puisse l'ÉTERNEL nous unir davantage.*

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail, plus particulièrement :

madame TIDOU Abiba Sanogo Épouse KONE, Professeur Titulaire d'Ecotoxicologie et Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé, pour m'avoir accepté et pour le travail abattu au sein de l'Institution qu'elle dirige.

monsieur KONE Tidiani, Professeur Titulaire d'Hydrologie et Vice-président de l'Université Jean Lorougnon Guédé, chargé de la Pédagogie, de la vie Universitaire, de la Recherche et de l'Innovation Technologique pour son engagement au service de l'Université, pour son humilité et pour les efforts en vue de la bonne marche de l'Institution.

monsieur AKAFFOU Doffou Sélastique, Professeur Titulaire de Génétique et Vice-président chargé de la Planification, de la Programmation et des Relations Extérieures de l'Université Jean Lorougnon Guédé, pour son implication au bien-être des étudiants.

madame TONESSIA Dolou Charlotte, Maître de Conférences de phytopathologie et Directrice de l'UFR Agroforesterie, pour avoir autorisé mon inscription dans son UFR.

monsieur KOUASSI Kouassi Clément, Maître de Conférences de Microbiologie et Sécurité Alimentaire et Vice doyen de l'UFR Agroforesterie pour sa disponibilité et ses conseils.

J'adresse également mes remerciements à :

monsieur KONATE Ibrahim, Professeur Titulaire de microbiologie et Biologie moléculaire, à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, pour avoir accepté la direction scientifique de ce mémoire. Ses conseils et orientations ont contribué à améliorer la qualité de ce manuscrit.

monsieur GROGA Noel, Maître de conférences de Biologie et Ecologie fonctionnelle, à l'université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, responsable du parcours de la filière Bioressource et Agronomie, pour ses conseils, sa disponibilité et surtout sa promptitude à résoudre les problèmes.

monsieur KOUASSI Kra Athanase, Maître-Assistant de Microbiologie et Sécurité Alimentaire à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, qui a guidé mes premiers pas dans la recherche et qui a suivi ce travail depuis sa conception jusqu'à sa réalisation. Sa disponibilité,

sa rigueur scientifique, son ardeur au travail et surtout la confiance qu'il a placée en moi, ont contribué efficacement à mener ce travail à terme, dans de très bonnes conditions.

Sa très grande générosité et sa bienveillance à mon égard ont parfois fait de lui un père pour moi. Je lui serai reconnaissant durant toute ma vie. Puisse Dieu Tout-Puissant lui accorder la grâce et le bonheur auxquels il aspire.

monsieur BAKAYOKO Sidiky, Professeur Titulaire de Agro-pédologie, à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance de ce mémoire.

monsieur COULIBALY Ibourahema, Maître de conférences de Microbiologie et Bio-industries, à l'université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, pour l'intérêt qu'elle a accordé à ce travail en acceptant d'examiner ce mémoire.

Je remercie mes parents, ainsi qu'à tous mes amis, merci pour vos soutiens et conseils.

Je tiens également à témoigner ma gratitude à mes deux grandes sœurs **KENA Rosita** et **TOGBA Nadia**, merci pour vos soutiens financiers.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance à la famille **KAKOU** et **GBO**, merci pour tous vos conseils et bénédictions.

LISTES DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

° C : Degré celsius

% : Pourcentage

μM : Micromètre

BG+: Bacille Gram positive

BG-: Bacille Gram negative

Cat: Catalase

CG+: Coccobacille Gram positive

Cit: Citrate

INS: Institut National de la Statistique

LDA: Lysine Désaminase

LDC: Lysine Décarboxylase

Man: Mannitol

ONU: Organisation des Nations Unies

PCA: Plate Count Agar

TSN : Tryptone Sulfite Néomycine

UFC: Unité Formant Colonies

VRBG : Violet Red Bile Glucose

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I: Description macroscopique des colonies isolées des racines	20
Tableau II: Tests d'identification microscopique de quelques germes isolés des racines	22
Tableau III : Identification par le Portoir réduit de Leminor des isolats présumptifs de <i>Escherichia coli</i>	24

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1: Site détruit et contaminé	11
Figure 2: Localisation de la zone d'étude (sous-préfecture de Kokumbo)	11
Figure 3 : Nodules et racines issues du site aurifère contaminé de Kokumbo, A : Nodules, B : Racines	12
Figure 4 : Colonies de Rhizobium observées sur boîte de Pétri.....	21
Figure 5 : Rhizobium observé au microscope optique (Gx100)	23
Figure 6 : Répartition des isolats issus des racines	25

Introduction

Les travaux des anthropologues sur l'extraction aurifère, nous renseignent que, l'activité serait apparue au Moyen Age en Afrique de l'Ouest notamment au Burkina, en Côte d'Ivoire où le commerce de l'or était pratiqué dans la zone transsaharienne ainsi que dans celle du golfe de Guinée (Kiethega, 1983; Bantenga, 1995; Amutabi & Lutta-Mukhebi, 2001). Cette technique qui consiste à extraire les métaux précieux en utilisant des outils rudimentaires tels que les pioches et les dabs fait appel à une large main d'œuvre (Labonne, 1996; Hinton *et al.*, 2003) et est souvent pratiquée dans des conditions dangereuses et illégales. À partir des années 1980 cette activité suscite un intérêt progressif du fait de la sécheresse abondante qui sévit dans le Sahel, créant une grande famine et un manque de revenus pour les populations concernées (Kiethega, 1983; Werthmann, 2003). Dès lors, elle est officiellement reconnue par les agences de développement internationales (ONU) comme activité à part entière pouvant générer des revenus pour les ménages dans les zones rurales des pays les moins développés permettant de ce fait de réduire la pauvreté et d'améliorer les conditions de vie de ces populations (Noetsaller, 1987).

Aujourd'hui, l'exploitation minière artisanale de l'or est une activité économique devenue indissociable du développement économique de quelques pays d'Afrique de l'Ouest tels que le Ghana, le Burkina Faso, la Côte d'Ivoire, le Mali (Ndela, 2008).

Pour mieux gérer l'expansion de l'orpaillage, le gouvernement ivoirien a adopté un programme national triennal (2014 - 2016) de rationalisation de l'exploitation minière artisanale afin de nettoyer, organiser et superviser l'activité (Ministère de l'Industrie et des Mines, 2013). Cependant, dans le souci de diversification des sources de revenu, l'orpaillage qui dispose localement d'un potentiel relativement intéressant, est apparu comme une alternative porteuse à partir de 1998. Il en résulte une prolifération des sites d'orpaillage qui induit une réduction des espaces de productions agricoles et un abandon des cultures au profit de l'or. Cet état de fait, conjugué à l'immigration massive des populations à la recherche du mieux-être a créé une pression sur les ressources foncières et alimentaires.

Par ailleurs, l'orpaillage est une activité qui fait intervenir des produits chimiques et des pratiques qui sont dangereux pour l'environnement. À Kokumbo, l'orpaillage implique l'utilisation du mercure pour amalgamer l'or et le cyanure pour le lixivier. Cette activité conduit au rejet de ces produits toxiques dans l'environnement sans aucun traitement préalable. Ces produits toxiques peuvent provoquer divers effets nuisibles tels la modification de la composition et de la structure des populations microbiennes, la pollution de l'environnement (Kozdrój & Van , 2001; Satchanska *et al.*, 2005) et la réduction de la diversité microbienne (Sandaa *et al.*, 1999). Du fait que les microorganismes jouent un rôle clé dans l'environnement,

les facteurs qui affectent donc leur diversité et leur activité peuvent menacer la fertilité des écosystèmes. L'agriculture se trouve concurrencée par l'orpaillage traditionnel, tant dans l'usage des sols, que dans l'emploi de la main d'œuvre et des migrations entre régions transformant les dynamiques sociales. Cette situation interroge donc fondamentalement la stabilité du monde rural et la façon dont les transformations qui l'affectent sont gérées tant localement que nationalement.

Au vu des multiples problèmes sanitaires, sécuritaires et environnementaux générés par l'orpaillage, certaines approches peuvent contribuer à l'élimination de cette contamination comme la bioremédiation qui s'avère une technologie simple utilisant les microorganismes pour remédier les sites contaminés. Cette technique est économique, efficace, et respecte l'environnement (Romdhane, 2010). La bioremédiation consiste à utiliser des processus biologiques pour réduire la mobilité ou transformer les polluants en composés non toxiques dans les milieux naturels. Ces processus biologiques sont stimulés par des microorganismes, des plantes et des enzymes (Leyval, 2008).

C'est dans cette optique que s'inscrit notre étude qui a pour objectif général d'évaluer et de caractériser les microorganismes présents sur les racines et les nodules issus du site d'orpaillage de Kocoumbo et qui ont une activité de bio-remédiation propice pour l'agriculture.

Il s'agit spécifiquement de :

- ✓ Isoler les microorganismes endophytes à partir des racines et nodules échantillonnés sur le site minier de Kokumbo ;
- ✓ Effectuer une caractérisation phénotypique des isolats issus des échantillons de racines et des nodules.

Outre l'introduction, la conclusion, les perspectives et les références, le présent mémoire est subdivisé en trois parties. La première partie présente les généralités sur l'orpaillage artisanale, la rhizosphère, les nodules, la bioremédiation et les microorganismes pouvant remédier un site contaminé et favorables à l'agriculture. La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail. La dernière partie présente les principaux résultats obtenus au cours de cette étude, suivie de la discussion.

Première partie: Généralités

1- ORPAILLAGE OU EXPLOITATION MINIÈRE ARTISANALE DE L'OR

1-1- Définition

L'exploitation minière artisanale est définie comme toute activité qui consiste à extraire et à traiter les minéraux pour récupérer des biens échangeables en utilisant des outils et des méthodes traditionnelles et artisanales. Ces méthodes n'utilisent ni énergie mécanique, ni appareil sophistiqué.

1-2- Impacts positifs de l'orpaillage

Les impacts positifs regroupent principalement les impacts économiques occasionnés par l'extraction artisanale à savoir la création d'emploi et l'accès à de nouveaux produits et services (Kitula, 2006; Sangaré, 2016).

L'extraction artisanale peut constituer un moyen de diminuer la précarité des populations lorsque celles-ci arrivent à éviter le cercle vicieux de pauvreté et à mieux gérer leurs gains en évitant les gaspillages par exemple. En effet cette activité augmente le revenu des personnes directement impliquées aussi bien que celles indirectement impliquées (Kitula, 2006; Dondeyne & Ndunguru, 2009). Les agriculteurs qui pratiquent l'orpaillage pendant la saison sèche tirent un revenu supplémentaire qui leur sert à soit acheter des intrants pour leur activité ou encore améliorer leur quotidien en s'offrant des repas supplémentaires (Banchirigah & Hilson, 2010).

1-3- Impacts négatifs de l'orpaillage

Parmi les impacts négatifs, on distingue les impacts sur les ressources naturelles, les problèmes sociaux.

1-3-1- Impacts sur les ressources naturelles et l'environnement

Un des thèmes les plus discutés dans la littérature sur l'extraction minière reste son impact sur l'environnement à travers les problèmes causés par cette activité à savoir : la pollution de l'air et des cours d'eau, la contribution au réchauffement climatique (Azapagic, 2004; Banchirigah, 2006; Kitula, 2006; Garvin *et al.*, 2009). La pollution des cours d'eau vient principalement de l'utilisation massive du mercure et du cyanure de par leur facilité d'utilisation, leur efficacité dans la capture de l'or, leur accessibilité (facilité de transport) et leur faible prix (Kitula, 2006; Telmer & Veiga, 2009). De manière précise, le mercure est relâché dans l'environnement via l'air et l'eau pendant les différents processus de traitement de l'or (Hinton *et al.*, 2003; Telmer & Veiga, 2009). En plus du mercure, le cyanure est également utilisé sur le site minier. Ce dernier est également transporté par les eaux de pluie qui les relâchent dans les cours d'eau. Ces

deux composants chimiques vont contaminer la faune et la flore aquatique (Maponga & Ngorima, 2003; Telmer & Veiga, 2009). La contribution au réchauffement climatique provient de la déforestation, la dégradation des sols provenant de l'abandon des puits de mine, qui détruisent les terres notamment agricoles, les prairies, les ressources de la faune et de la flore. En effet, le système traditionnel de jachère qui permet de renouveler les nutriments nécessaires pour les cultures prochaines ne peut plus être maintenu à cause de l'utilisation des terres agricoles pour les besoins de l'orpaillage. Ce qui a pour effet direct une diminution de la surface agricole ainsi que de la fertilité des sols et donc un impact considérable sur la production agricole (**Figure 1**).



Figure 1 : Site détruit et contaminé

1-3-2- Problèmes sociaux

Les problèmes sociaux générés dans les communautés minières sont : les problèmes sanitaire liés à l'exposition aux produits chimiques ou aux conditions de travail et les problèmes de sécurité tels que les accidents de travail; ainsi que les maux sociaux de façon générale tels que la prostitution, le travail des enfants, la déscolarisation (Banchirigah, 2006; Arnaldi & Lanzano, 2014).

2- LA RHIZOSPHERE

2-1- Définition

Décrit pour la première fois en 1904 par l'agronome allemand Hiltner Lorentz, le terme « rhizosphère » est composé du mot grec « *rhiza* » pour racine et du mot latin « *sphaera* » pour cercle d'influence et est utilisé pour illustrer la fraction de sol dans laquelle la croissance des microbes est influencé par l'existence du système racinaire (Balzergue, 2012). La rhizosphère, considérée comme le plus grand écosystème terrestre, est la partie du sol proche des racines des

plantes, s'étendant de la surface des racines à l'intérieur du sol sur 1 à 3 mm (Anonyme, 2021). Dans cette région édaphique, les plantes interagissent avec le sol et ses micro-organismes, ce qui apporte de nombreux avantages aux plantes en améliorant la fertilité du sol tout en favorisant la dégradation des produits chimiques toxiques. Il s'agit d'une association connue sous le nom de rhizocénose, qui permet soit l'obtention de nourriture, comme dans les mycorhizes, soit la fixation de l'azote. Ce processus implique généralement des bactéries appelées rhizobactéries, telles que *Azospirillum*, *Azobacter* et *Bacillus* (facteurs de croissance des plantes) dans les racines (Anonyme, 2021).

2-2- Microorganismes rhizosphériques.

Les microorganismes du sol diffèrent d'une plante à une autre, qualitativement et quantitativement (Gobat *et al.*, 2010). En libérant massivement des rhizodépôts dans le sol, les racines sont susceptibles d'attirer à la fois des microorganismes bénéfiques et pathogènes. Les tissus de la racine peuvent même leur servir d'habitat. Hors du cas bien connu des mycorhizes et des nodosités fixatrices d'azote, on constate que certaines bactéries vivent au contact direct de la racine et pénètrent dans les tissus rhizodermiques et corticaux, sans pour autant être parasites ou prédatrices. On appelle « histosphère », la région où les microorganismes habitent l'intérieur des tissus mais restent localisés à l'extérieur des cellules, et la « cytosphère », où les microorganismes habitent l'intérieur même des cellules (Gobat *et al.*, 2010).

Les exsudats racinaires influencent sélectivement la croissance des bactéries et champignons qui colonisent la rhizosphère en modifiant la chimie du sol dans le voisinage de l'usine racinaire et en servant comme substrats de croissance sélective pour les microorganismes du sol. Ces derniers, à leur tour, influencent la composition et la quantité des différents composants d'exsudats racinaires par leurs effets sur les pertes des cellules racinaires, le métabolisme cellulaire, et la nutrition des plantes (Yang et Crowley, 2000).

À partir de cette particularité, les communautés microbiennes de la rhizosphère peuvent varier dans la structure et la composition des espèces dans les différentes parties du système racinaire, et cette variation dépend aussi du type du sol, des espèces végétales, de l'état nutritionnel, de l'âge, de la présence d'un stress ou de maladie et d'autres facteurs environnementaux (Reddy *et al.*, 2014).

2-3- Diversité des microorganismes rhizosphériques

De nombreuses recherches ont montré que la diversité et l'activité des microorganismes sont fortement élevées à proximité de la racine étant donné que c'est dans cette zone que se manifeste

l'effet rhizosphérique. Parmi les microorganismes couramment rencontrés dans la rhizosphère se trouvent les bactéries, les champignons microscopiques (Morel, 1996), les virus, les algues, les protozoaires et un groupe très particulier qui est constitué par les actinomycètes ou bactéries filamenteuses (Iwai *et al.*, 1992).

2-4- Propriétés et valorisations des microorganismes rhizosphériques

Les microorganismes présents à proximité de la racine ont des propriétés différentes de celles du sol nu (sans végétation). Certains microorganismes rhizosphériques peuvent jouer un rôle majeur dans la décontamination du sol ou absorber les substances toxiques pour les transformer en composés moins toxiques (Paskiewicz, 2006). Ils jouent aussi un rôle dans la modification du pH du sol (acidification et alcalinisation) (Belyagoubi, 2014). Cependant, les rôles bénéfiques les plus connus sont l'amélioration de la croissance des plantes par divers mécanismes, la protection de la plante contre les agents pathogènes et l'amélioration de la propriété biotique et abiotique du sol (Schardl *et al.*, 2004). Les interactions entre les microorganismes bénéfiques et non bénéfiques existent naturellement mais l'issue dépend généralement des propriétés du sol, de l'état physiologique de la plante et des aléas climatiques.

2-5- Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

La symbiose associative est une interaction à bénéfices réciproques entre les plantes et les microorganismes. Cette symbiose est habituellement considérée comme une interaction facultative, à large spectre d'hôte, et avec peu ou pas de différenciation des deux partenaires. L'exemple le mieux connu est celui des bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes (Richardson *et al.*, 2009 ; Vacheron, 2013).

Lorsque des rhizobactéries contribuent à la croissance des plantes, elles sont appelées : PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Kloepper *et al.*, 2004). Le terme PGPR a été introduit pour la première fois à la fin des années 1970, lorsqu'il a été démontré, par Kloepper et Schroth, que des souches de *Pseudomonas* fluorescentes ont amélioré le rendement des cultures de pommes de terre jusqu'à 50% par la production de sidérophores ; chélateurs de fer, privant les bactéries pathogènes indigènes de fer (Garcia *et al.*, 2003). Seulement 1 à 2% des bactéries favorisent la croissance des plantes dans la rhizosphère (Beneduzi *et al.*, 2012). Ces rhizobactéries colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs. À la différence des autres bactéries rhizosphériques, elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (Vacheron *et al.*, 2013). Par leur action enzymatique, elles solubilisent les éléments nutritifs présents dans les réserves organiques et

minérales du sol tels que : le phosphate, l'azote et le fer, et les mettent à la disposition de la plante sous forme d'ions minéraux assimilables, à des taux qui correspondent à ses besoins, et ce, aux différents stades de sa croissance. Les ions métalliques sont absorbés par les poils absorbants des racines, se marient au glucose qui remonte vers les organes aériens pour former de nouvelles cellules (Gagnon, 2015). Ces bactéries bénéfiques peuvent donc influencer l'acquisition des nutriments et aussi moduler les taux d'hormones et atténuer les impacts négatifs des facteurs biotiques et abiotiques (Ahemad et Kibret, 2013).

De plus, les PGPR se trouvent dans des environnements hautement compétitifs. En conséquence, elles ont développé plusieurs moyens offensifs pour cette compétition intra et interspécifiques, comme: des substances antibiotiques, des enzymes bactériolytiques et des toxines de nature protéique communément connues sous le terme de bactériocines. Ces toxines sont capables de tuer les bactéries compétitives étroitement liées sans pour autant affecter la bactérie productrice (Beneduzi *et al.*, 2012 ; Mezaache-Aichour *et al.*, 2016).

3- QUELQUES MICROORGANISMES RETROUVES SUR LES RACINES ET NODULES

3-1- *Clostridium*

Ce sont les bactéries anaérobies stricts et libres qui se trouvent dans le sol et qui sont capables de transformer l'azote atmosphérique en azote organique utilisable par la plante (Gans *et al.*, 2005).

3-2- *Bacillus*

Les *Bacillus* sont des bactéries à Gram+, appartenant à la famille des Bacillacées. De forme bacilles, elles sont aérobies ou anaérobies facultatives, et tirent leur énergie de la respiration ou de la fermentation. Ces bactéries produisent des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. Elles jouent un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. L'espèce *Bacillus thuringiensis* se distingue des autres bacilles du groupe *cereus* par sa capacité à synthétiser et excréter des cristaux mortellement toxiques pour certains insectes. Ces cristaux agissent en détruisant les cellules de l'intestin moyen des larves des insectes atteints par ces toxines (Gans *et al.*, 2005).

3-3- *Pseudomonas*

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulées, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. C'est une bactérie rhizosphérique phyto protectrice des racines. Elle crée un bio film adhésif et protecteur (mucilage microbien). Elle a également la capacité de solubiliser le fer (Gans *et al.*, 2005).

3-4- *Escherichia coli*

Les *Escherichia coli* sont des bacilles droits, ayant un diamètre de 0,3-1,8 µm. Les cellules prennent une coloration à Gram négatif étant mobiles (flagelles péritriches) ou immobiles. Ce sont des germes anaérobies facultatifs et chimioorganotrophes ayant un métabolisme simultanément de type fermentatif et respiratoire. De type oxydase négative et catalase positive, la plupart réduisent les nitrates, excepté certains genres ou espèces (Avril *et al.*, 2000).

3-5- *Rhizobium*

Les Rhizobiums sont des bactéries du sol capable d'induire des nodules sur les racines ou les tiges de légumineuses et assurer la fixation de l'azote atmosphérique à l'intérieur de ces organes. En contrepartie de la fixation d'azote, les rhizobiums obtiennent un approvisionnement stable de carbone dérivés des composés de la photosynthèse (Longfei Zhao *et al.*, 2010).

3-6- *Staphylococcus aureus*

Le *Staphylococcus aureus* est une bactérie de la famille des Micrococcaceae de forme sphérique (coque), de 0,5 µm à 1,5 µm de diamètre. Ces coques à Gram positif se présentent généralement en grappes, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture. C'est une bactérie non mobile, asporulée et aérobie facultatif possédant une catalase. Les staphylocoques trouvés dans l'eau et sol proviennent principalement de la peau, de la bouche, du nez et de la gorge des baigneurs et occasionnellement d'une pollution fécale (Longfei Zhao *et al.*, 2010).

4-NODULATION

4-1- Définition

Le nodule est un nouvel organe produit par la plante hôte au sein duquel les bactéries, différenciées en bacteroides, fixent l'azote atmosphérique. Pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, enzyme irréversiblement inactive par l'oxygène, la plante maintient les nodules en condition de microoxie grâce au parenchyme nodulaire pendant que l'hémoglobine

transporte et tamponne la concentration d'oxygène indispensable à la respiration. Les nodules sont majoritairement racinaires mais peuvent parfois être caulinaires.

4-2- Processus de nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien. L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (Madigan *et al.*, 2007). La symbiose commence par l'attachement des bactéries aux poils absorbants des racines de la plante légumineuse en germination ; on pense que cette liaison initiale dépend d'une reconnaissance cellulaire entre des molécules de surface comme des glycoprotéines des bactéries et de la plante. La bactérie est encapsulée dans une poche de la paroi cellulaire et portée dans les profondeurs de la racine par la formation d'un filament infectieux constitué principalement de cellulose. Les cellules corticales sur l'extérieur de la racine se différencient pour former un méristème, un tissu végétal formé de cellules indifférenciées, siège de divisions rapides et nombreux, situé dans les régions de croissance de la plante, qui grandit et fait saillie pour former une nodosité. Les filaments infectieux qui prolifèrent libèrent alors les bactéries dans le cytoplasme de cellules hôtes, après avoir été recouvertes d'une membrane spéciale synthétisée par l'hôte, connues sous le nom de bactéroïdes. Au sein de cet environnement extrêmement protecteur, les bactéries se différencient finalement pour atteindre un stade de fixation de l'azote, en dérégulant les gènes de la nitrogénase et des cytochromes spécifiques des bactéroïdes. (Pelmont, 1995).

5- BIOREMEDIATION

5-1- Définition

La bioremédiation est une méthode basée sur l'activité de la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes vivants, généralement sont soit des bactéries, des micro-algues ou des champignons, dégradants les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique. Ces organismes peuvent être déjà présents dans la zone polluée (indigènes) ou ajoutés au milieu (exogène), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol. La bioremédiation se déroule généralement en condition d'aérobie, toutefois l'application des systèmes de bioremédiation en condition d'anaérobie permet de dégrader un certain nombre de molécules récalcitrantes (Chedly Abdelly, 2006).

5-2- Quelques techniques de la bioremédiation

Il s'agit de traitements biologiques directement appliqués sur le site à dépolluer. Ils ont l'avantage de ne pas nécessiter d'excavation et de permettre, éventuellement, la poursuite des activités.

5-2-1- Bioremédiation intrinsèque ou bioatténuation

C'est simplement la biodégradation naturelle des polluants par les microorganismes présents dans le sol. Cette méthode consiste uniquement à vérifier la présence et la capacité des microorganismes utilisés pour dégrader les polluants (Khalil hanna, 2004)

5-2-2- Biostimulation

Cette technique consiste à remonter l'activité des populations microbiennes présentes dans le sol par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu qui sont le potentiel d'oxydo-réduction, l'humidité et la température (Khalil hanna, 2004).

5-2-3- Bioaugmentation

Cette technique est utilisée lorsque l'activité des microorganismes indigènes est insuffisante. Il s'agit d'ajouter des micro-organismes étrangers spécialisés. Une des voies de recherche actuelle est l'utilisation de micro-organismes génétiquement modifiés pour la dégradation des polluants récalcitrants (Khalil hanna, 2004).

5-2-4- Bioinjection

C'est la fragmentation des grosses molécules par le couplage de l'injection d'air ou d'oxygène à l'activité biologique normale des micro-organismes suivi d'un entraînement par le flux gazeux (Khalil hanna, 2004).

5-2-5- Bioextraction

Elle suit le même chemin sauf que c'est un couplage de l'activité biologique des microorganismes et de l'extraction sous vide des polluants (Khalil hanna, 2004).

Deuxième partie : Matériel et méthodes

1- DESCRIPTION DE LA ZONE D'ÉTUDE

Située dans la région du bélier, au centre de la Côte d'Ivoire, la localité de Kokumbo appartient au département de Djékanou. Elle se localise entre les latitudes 6°19' et 6°34'N et les longitudes 5°6' et 5°20'W et est le chef-lieu d'une sous-préfecture comprenant 5 villages : Kpléssou, Konankro, Kokumbo, Akroukro et Kimoukro (**Figure 2**). Sa superficie est de 330 km² et sa population est estimée à 30000 habitants (INS, 2014). La région est située dans le climat baouléen. C'est un climat humide, commun à la zone forestière dense (Chauveau, 1979). Il se caractérise par deux saisons des pluies séparées par deux saisons sèches. Les précipitations sont en moyenne de 1092 mm par an. La principale saison des pluies est de mars à juin et la mineure de septembre à octobre. La grande saison sèche est de novembre à février et la petite de juillet à août. La température annuelle moyenne est d'environ 27 °C.

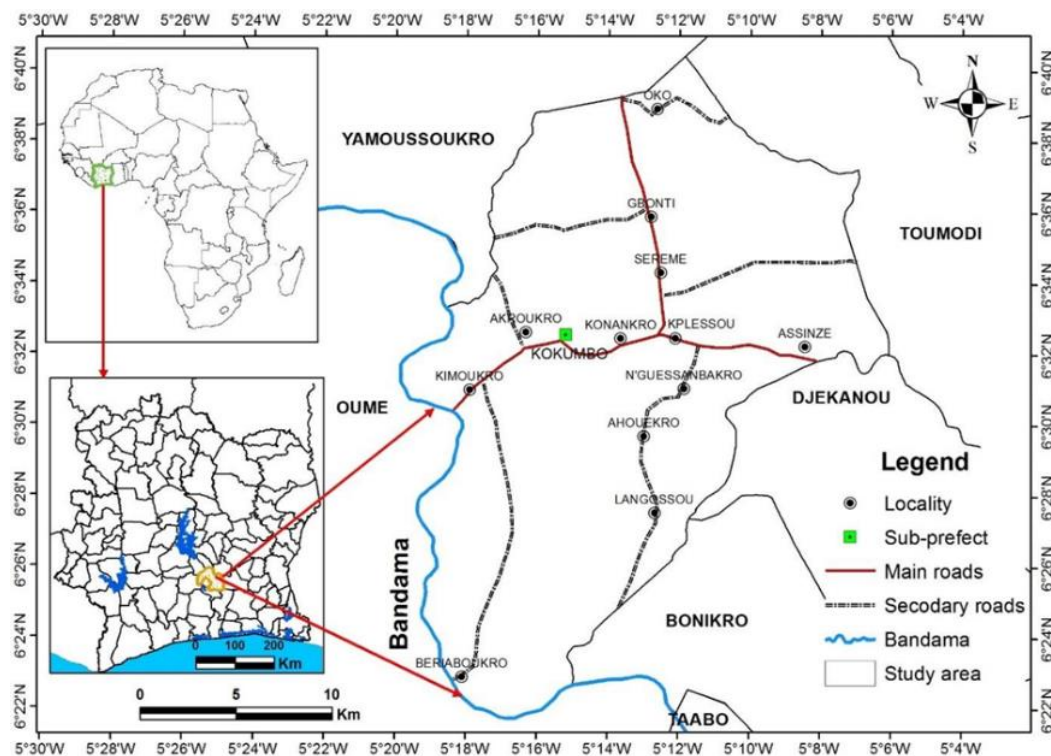


Figure 2: Localisation de la zone d'étude (sous-préfecture de Kokumbo)

2- MATERIEL

2-1- Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé pour ce travail est composé des racines et de nodules issues des sites contaminés par l'activité de l'orpillage de Kokumbo (**Figure 3**).



Figure 3: Nodules et racines issues du site aurifère contaminé de Kokumbo, A : Nodules, B : Racines

2-2- Matériel technique

2-2-1- Appareillage

L'appareillage est constitué d'une balance de type KERN pour les différentes pesées, un autoclave de type NÜVE model OT012 a été utilisé pour réaliser les stérilisations et aussi un bain marie (Fisher Scientific Polytect 12) pour le refroidissement des milieux de cultures à 50°C. Les différents incubateurs ayant servi aux analyses sont : Memmert Model Uf750, Memmert Beschickung/ Loading-Modell 100-800 Et Neo-Tech Sa.

2-2-2- Consommable

Le consommable utilisé est composé de boîtes de Pétri stériles (90 mm de diamètre), des flacons avec bouchon autoclavable pour la préparation des milieux de culture, des pipettes stériles de 1mL et de 5mL, une pipette Pump, des tubes à essai à vice, des erlenmeyers pour les suspensions mères. Une anse de platine, des étaleurs, une bouteille de gaz avec bec bunsen, des béchers, des éprouvettes graduées, des sachets stomacher ainsi que tout le matériel classique d'un laboratoire.

2-2-3- Milieux de culture

Les milieux de culture ayant servi à la réalisation de cette étude sont les suivant :

- Le bouillon Eau Peptonée Tamponnée (EPT) (**Difco**)TM est utilisé dans les phases d'enrichissement et de pré enrichissement des échantillons pour les analyses ;
- La gélose Sabouraud au Chloramphénicol (Alpha Biosciences) est utilisée pour le dénombrement des levures et moisissures dans les racines;

- Le milieu PCA est utilisé pour le dénombrement des rhizobiums;
- La gélose VRBG est utilisée pour le dénombrement des entérobactéries présentes dans les racines ;
- Le milieu Cetrimide est un milieu utilisé pour le dénombrement des *Pseudomonas aeruginosa*;
- Le milieu TSN est utilisé pour le dénombrement des *Clostridium*;
- Le milieu Mossel est utilisé pour le dénombrement des *bacillus* ;
- Le milieu Rapid *Staph* est utilisé pour la sélection et le dénombrement des *staphylococcus aureus*;
- Le milieu Rapid *E. coli2* est utilisée pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli*.

3- METHODES

3-1- Échantillonnage des racines

3-1-1- Choix et site d'échantillonnage

Le choix du site des prélèvements des échantillons a porté sur le site des activités minières de Kocoumbo. Un site d'extraction d'or est clandestin et rudimentaire.

3-1-2- Taille et répartition des échantillons

Au cours de ce travail, huit échantillons ont été collectés pour la réalisation de cette étude. Ils sont composés de trois échantillons de racines et cinq échantillons de racines portant des nodules issus du site des activités minières de Kokumbo.

3-1-3- Prélèvement et transport des racines

Les échantillons sont prélevés aseptiquement à une profondeur d'environ 15 cm. Les racines ont été placés dans des sachets stériles.

3-1-4- Collecte, transport et conservation des nodules

La collecte a été réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran (Hoben 1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, se débarrasser de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Couper les racines et les mettre dans des sacs en plastique et les transporter immédiatement au laboratoire. Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau, puis à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachés 1 à 2 mm du site d'attache, en fin séchés avec du papier filtre avant leur conservation.

Les nodules séchés au papier filtre sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 heures pour un usage immédiat. Pour une longue conservation allant de 6 à 12 mois, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur qui est le chlorure de Calcium (CaCl₂) (Vincent, 1970).

3-2- Technique d'analyse microbiologique

3-2-1- Préparation des milieux de culture

Les différents milieux de cultures qui ont servis aux analyses microbiologiques ont été préparés selon les prescriptions des fabricants mentionnées sur les différentes boîtes.

3-2-2- Préparation de la suspension mère

La préparation de la suspension mère a été réalisée selon la norme NF EN ISO 6887-1 qui définit les règles générales pour la préparation de la suspension mère en vue d'examen microbiologiques. Une quantité de 10 grammes de chaque échantillon est pesée aseptiquement à l'aide d'une balance (KERN) puis déposés dans un Erlenmeyer. Un volume de 90 mL d'Eau Peptonée Tamponnée y est ajouté pour la revivification. Le mélange a été homogénéisé pendant 1 minute pour obtenir la suspension mère correspondant à la dilution. Cette solution est laissée au repos pendant 30 min, pour une revivification des microorganismes à la température ambiante.

3-2-3- Ensemencement, incubation

Les suspensions mères obtenues ont été ensemencées par stries sur les différentes boîtes contenant les différents milieux de culture. Ces milieux ont été préparés et coulés à raison de 20 mL par boîte pour la réalisation du travail. Ainsi, les milieux Mossel pour la recherche de Bacillus, Rapid *staph* pour la recherche des staphylocoques, Cétrimide pour la recherche de *Pseudomonas*, Rapid *E. coli* 2 pour la recherche de *Escherichia coli* et PCA pour la recherche des rhizobiums ont été ensemencés. Pour la recherche des *clostridium*s, une quantité de 20 mL de l'inoculum est traitée à 80°C pendant 10 min puis refroidi à l'eau contenant de la glace. L'inoculum traité est ensemencé par strie sur le milieu TSN préparé et coulé en boîtes de Pétri. Une deuxième couche de milieu TSN est coulée à la surface de la première pour maintenir l'anaérobiose. Les boîtes de Pétri ensemencées sont toutes incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

3-2-4- Isolement des souches à partir des racines

Cette étape consiste à isoler les microorganismes à partir des échantillons de racines issues du site des activités minières. Après l'incubation des boîtes de Pétri, les différentes colonies isolées

sur chaque boîte de Pétri, sont prélevées et ensemencées à nouveau sur une gélose nutritive par strie. Les boîtes de Pétri ensemencées sont toutes incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

3-2-5- Protocole d'isolement des souches à partir des nodules

Les différentes étapes d'isolement des rhizobiums sont celles décrites par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994).

D'abord, Les nodules sont lavés délicatement à l'eau de robinet et les racines portant ces nodules sont prélevées. Puis ils sont stérilisés par immersion dans une solution de chlorure mercurique HgCl₂ à 0,1 % (m/v) pendant deux (2) minutes en vue d'éliminer le plus de bactéries possibles de la rhizosphère.

Ensuite, les nodules sont rincés 10 fois dans de l'eau distillée stérile et sont laissés gonfler après le 10^e rinçage. Les nodules sont écrasés dans des dans des boîtes de Pétri stériles contenant 1 mL NaCl 8,5 % à l'aide d'une anse de platine jusqu'à obtenir une suspension laiteuse.

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble, à l'aide d'une anse de platine, le jus de nodule est ensemencé par strie sur une boîte de Pétri contenant le milieu PCA préalablement préparé et coulé selon les prescriptions du fabricant. Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 72 heures pour l'isolement.

3-2-6- Purification et conservation des souches

Les isolats obtenus sont ensemencés par strie sur la gélose nutritive jusqu'à l'obtention des cultures pures. Les souches pures sont conservées à -20°C dans du glycérol pour la suite des travaux (Lemriss *et al.*, 2003).

3-3- Caractérisation phénotypique des souches

3-3-1- Caractérisation macroscopique

Cette technique consiste à examiner les colonies par la loupe binoculaire (ZEISS 475022 G x10) et à l'œil nu (Williams & Cross, 1971). Les caractéristiques macroscopiques sont basées sur la taille, la forme, la texture, l'observation des mycéliums (substrat et aérien) et les pigmentations diffusibles sur les milieux de culture (wei *et al.*, 2014).

3-3-2- Caractérisation microscopique des souches par la Coloration de Gram

C'est un test qui permet la distinction entre deux groupes bactériens, Gram positif et Gram négatif. Le frottis coloré se réalise sur des bactéries mortes. Sur une lame propre, une goutte

d'eau distillée stérile est déposée. Les bactéries Gram positif retiennent la coloration violette du violet de gentiane tandis que les bactéries Gram négatif peuvent être décolorées par l'alcool et sont ensuite colorées en rose avec la safranine.

3-3-3- Caractérisation biochimique

3-3-3-1- Test d'oxydase

La recherche de l'oxydase est un test fondamental pour l'identification des bacilles à Gram négatif. Le test oxydase a été réalisé grâce à des disques d'oxydase prêts à l'emploi contenant de l'oxalate N- diméthyl-paraphénylène diamine. Les bactéries oxydases positives dégradent le substrat sur le disque et donnent une coloration violette foncée après quelques secondes (Marchall *et al.*, 1982).

3-3-3-2- Test de catalase

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H₂O₂ à 10 volumes. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Lévy *et al.*, 1992).

3-3-3-3- Test à la Lécithinase

La recherche de lécithinases a consisté à ensemencer les échantillons de racines sur la gélose Baird Parker ou Rapid *Staph* additionnée du jaune d'œuf au tellurite de potassium pour la recherche de *Staphylococcus aureus*. S'il y a apparition d'une zone opaque dans le halo transparent, la lécithine du jaune d'œuf a été dégradée, la bactérie possède une lécithinase par contre s'il n'y a pas de zones opaques dans le halo transparent, la lécithine du jaune d'œuf n'a pas été dégradée, la bactérie ne possède pas de lécithinase.

3-3-4- Identification biochimique de quelques isolats des racines et des présumés *E.coli* à l'aide du portoir réduit de Leminor

3-3-4-1- Mise en évidence de l'uréase

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée en ions d'ammonium et carbonate. La technique consiste à ensemencer un milieu urée-Tryptophane par une colonie bactérienne, incubé à 37°C pendant 24 heures. En cas de réaction positive, la décomposition de l'urée produit un dégagement d'ammoniac, faisant virer (le rouge de phénol présent dans le milieu au rose puis au rouge foncé.

3-3-4-2- Mise en évidence de la production d'indole

Le réactif Kovac est destiné à la mise en évidence de la production d'indole par les bactéries qui possèdent une tryptophanase. Le milieu urée estensemencé à partir des colonies jeunes de 24 heures issues de la gélose nutritive. Après incubation du milieu urée pendant 24 heures à 37°C, une goutte du réactif Kovac est ajoutée dans le tube contenant l'urée. Si la réaction est positive c'est à dire indole (+), il y a présence d'un anneau rouge vif bien marqué à la surface de l'urée.

3-3-4-3- Fermentation des sucres sur le milieu Kligler Hajna

Ce milieu permet d'étudier la fermentation du glucose, du lactose, d'apprécier la production ou non d'H₂S et la production ou non de gaz à partir du glucose. Ce milieu est coulé en pente et en culot. La technique consiste àensemencer le culot par piqûre, puis la pente par stries serrées. La lecture se fait après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C.

3-3-4-4- Test de mobilité sur le milieu Mannitol Mobilité Nitrate

Ce test est réalisé sur le milieu Mannitol Mobilité qui est coulé uniquement en culot. C'est un milieu semi-solide. Il estensemencé par piqûre centrale. Les germes immobiles ne poussent qu'au niveau de la piqûre centrale alors que les germes mobiles diffusent dans le milieu. Le virage du milieu du rouge au jaune traduit que les bactéries utilisent le mannitol.

3-3-4-5- Test à Lysine Fer

Ce test se réalise sur le milieu Lysine Fer qui est coulé en pente et en culot. Son nom découle de sa composition enrichie en fer. La technique consiste àensemencer le culot par piqûre puis la pente de la gélose par stries serrées, la lecture se fait après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C. Pour la lecture, les résultats seront interprétés en fonction de la coloration comme suit :

Culot jaune : LDC – : S'il y'a acidification du milieu par fermentation du glucose ;

Culot violet : LDC + : Si la bactérie fermente le glucose, et que le milieu a été ré-alcalinisé suite à la décarboxylation de la lysine ;

Pente violette : LDA – : S'il y'a absence d'acide cétonique ;

Pente jaune : LDA + : S'il y'a présence d'acide cétonique provenant de la désamination de la lysine.

3-3-4-6- Utilisation du Citrate comme seule source de carbone

Ce test est effectué sur le milieu citrate de Simmons qui contient le bleu de bromothymol comme indicateur de pH. Ce milieu est coulé uniquement en pente. La pente du milieu est

ensemencée avec une strie longitudinale puis incubé à 37 °C pendant 24 heures. Seules les bactéries capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone peuvent se cultiver sur ce milieu en l'alcalinisant. Le virage du milieu qui était vert au départ, au bleu ou la présence des colonies sur la pente signifie que les bactéries utilisent le citrate.

Troisième partie : Résultats et discussion



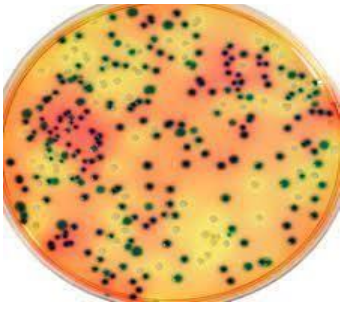
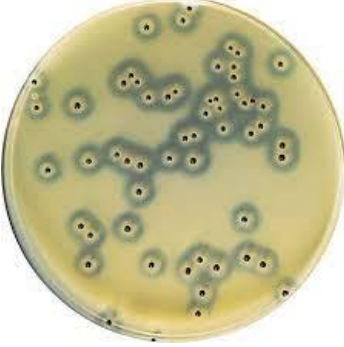

1-RÉSULTATS

1-1- Caractérisation macroscopique des souches

1-1-1- Caractérisation macroscopique des souches isolées des racines

Sur le milieu Cétrimide, les colonies de *Pseudomonas* sont de petites tailles ou de tailles moyennes avec des formes rondes. Elles sont souvent muqueuses ou grisâtres. Elles produisent des pigmentes allant du jaune au vert. Quant aux *Clostridium*, ce sont des grosses colonies noires dont la taille varie de 3 à 4 mm de diamètre avec des formes rondes. Les *E. coli* forment des colonies violettes à roses avec des tailles moyennes et des formes rondes. *Staphylococcus aureus* sont des bactéries de petites tailles ou de tailles moyennes variant de 0,7 à 2 mm de diamètre. Elles sont noires avec un halo translucide autour de la colonie. Les colonies de *Bacillus* se présentent sous forme de colonies de taille moyenne avec un halo blanchâtre au centre. Il y a production de lécithine due au jaune d'œuf émulsionné incorporé dans la gélose de base (**Tableau I**).

Tableau I: Description macroscopique des colonies isolées sur boîtes issues des racines

Milieu de culture	Germe recherché	Boîtes de Pétri	Caractères observés
Cétrimide	<i>Pseudomonas</i>		Pigment jaune-vert, colonies de taille moyenne, muqueuses, grisâtres, ronde
TSN	<i>Clostridium</i>		Colonies de grosse taille, noires, ronde
Rapid E. coli	<i>E. coli</i>		Colonies de taille moyenne, rose violet, ronde
Rapid Staph	<i>Staphylococcus aureus</i>		Colonies de taille moyenne, ronde, noire formant des holo translucide autour
Mossel	<i>Bacillus</i>		Colonies moyennes roses à contour irrégulier

1-1-2- Caractérisation macroscopique des Souches de Rhizobium isolées des nodules

Les colonies sont de tailles moyennes ou petites. Elles sont de couleur blanchâtre ou crème, avec des diamètres variant de 0,5 et 2 mm. Elles ont des formes rondes avec un contour régulier, une surface semi bombée et lisse. Elles sont translucides, visqueuses et brillantes, avec une texture homogène (Figure 4).

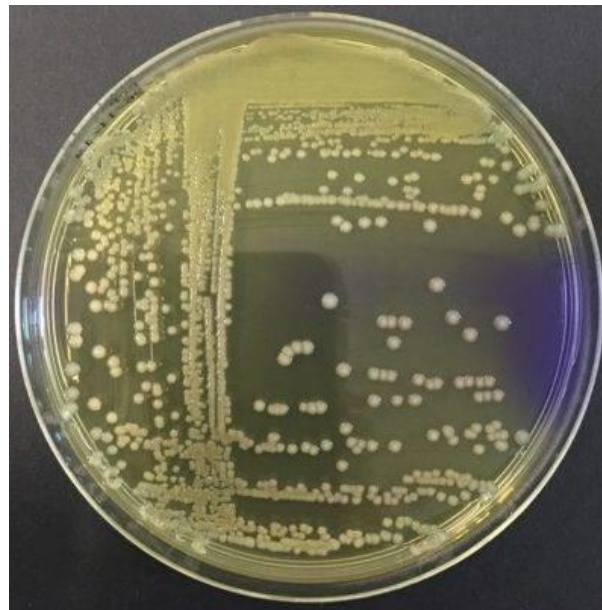


Figure 4 : Colonies de Rhizobium observées sur boîte de Pétri


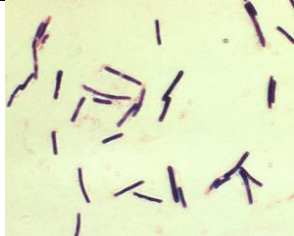
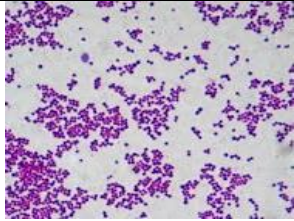
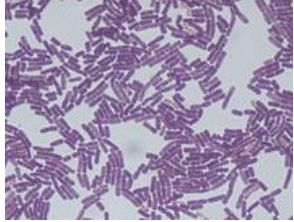

1-2- Caractérisation microscopique et biochimique des souches

1-2-1- Caractérisation microscopique et biochimique des souches isolées des racines

Des caractères microscopiques et biochimiques divers ont été observés au cours de ce travail. Parmi les caractéristiques biochimiques de *Pseudomonas*, il y a la production d'un cytochrome C oxydase et de la catalase positive. Il est mobile par ciliature et fermente le glucose en produisant du gaz. Le frottis coloré a montré que c'est bactérie gram négative ne produisant pas d'indole. Cette bactérie n'utilise pas le mannitol et le lactose. Cependant, elle utilise le citrate comme seule source de carbone. Concernant les *Clostridium*, il y a production de gaz et d'acide sulfurique. Il y a eu utilisation du glucose et la fermentation du mannitol et le test de mobilité a été négative. Elle est dépourvue d'une cytochrome C oxydase et ne produit pas de catalase. Il y a production de la lécithine due à la présence du jaune d'œuf additionné au milieu de base. Coques à Gram positif groupés en diplocoques et amas, immobiles. Il y a absence d'acidification du mannitol chez certaines souches et il y a présence chez d'autres. La catalase est positive tandis que l'oxydase est négative. Les souches de *Bacillus* ne produisent pas de cytochrome C oxydase, mais la catalase positive. Ce sont des bacilles Gram positive utilisant le citrate comme seule source de carbone. Ils

sont généralement mobiles. Les *E. coli* sont des bacilles droits, ayant un diamètre de 0,3-1,8 μm . Les cellules prennent une coloration à Gram négatif étant mobiles ou immobiles. Ces bactéries ayant un métabolisme simultanément de type fermentatif et respiratoire. Elles sont oxydase négative et catalase positive, la plupart réduisent les nitrates (**Tableau II**).

Tableau II: Tests d'identification microscopique et biochimiques de quelques germes isolés des racines

Isolats présumptifs de	Coloration de Gram	Tests de confirmation effectués	Confirmation du genre
<i>Pseudomonas</i>	 BG-	Gluc + mob + indol- cat+ oxy +, lact-, gaz+, uréé -, citrate +, man-,	<i>Pseudomonas spp</i>
<i>Clostridium</i>	 BG+	Lecithinase +, mob-, gluc+, Man+, H ₂ S+, gaz+, cat-, oxyd-	<i>Clostridium spp</i>
<i>Staphylococcus</i>	 CG+	Cat+, oxyd-, man-	<i>Staphylococcus spp</i>
<i>Bacillus</i>	 BG+	Cat+, oxyd-, cit+, mob+	<i>Bacillus spp</i>
<i>Escherichia coli</i>	 BG-	Cat+, oxyd-, mob ^{+ou-} ,	<i>Escherichia coli</i>

1-2-2- Caractérisation microscopique des souches isolées des nodules

Le frottis coloré réalisé sur les souches isolées des nodules a permis d'observer des bâtonnets de tailles différentes et des coccobacilles roses à Gram négatif compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia (**Figure 5**).

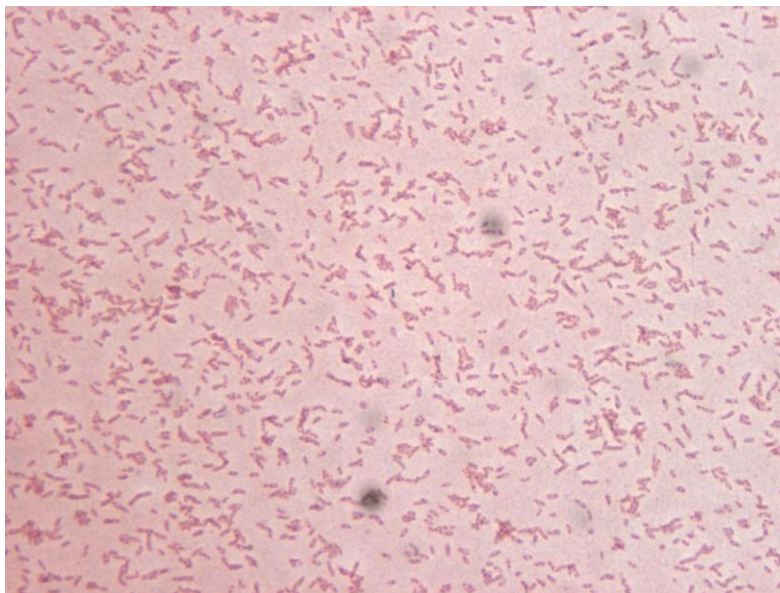


Figure 5: Rhizobium observé au microscope optique (Gx100)

1-2-3- Caractères biochimiques des isolats présumptifs de *E. coli* extraits des racines

Les isolats présumptifs de *E. coli* extraits des racines ont été identifiés à l'aide du portoir réduit de Leminor. L'analyse des différents caractères étudiés renseigne que tous les isolats ne sont pas des souches de *E. coli*. Par ailleurs plusieurs genres ont été donc identifiés. Il s'agit des genres *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia* et *Citrobacter*. Toutes ces bactéries sont des BG- , catalase positive et produisent du cytochrome C oxydase. L'analyse du tableau montre que tous les isolats fermentent le mannitol et produisent du gaz. Par ailleurs à l'exception des isolats de *Klebsiella* tous les autres isolats tels que *Proteus*, *Escherichia coli* et *Citrobacter* sont mobiles (**Tableau III**).

Tableau III : Identification par le Portoir réduit de Leminor des isolats présumptifs de *Escherichia coli*

Isolats	Gram	Cat	Oxyd	Urée	Ind	Gluc	Lac	Gaz	H ₂ S	Man	Mob	LDA	LDC	Cit	Nom
1	Bg-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Klebsiella</i>
2	Bg-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Klebsiella</i>
3	Bg-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Klebsiella</i>
4	Bg-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Klebsiella</i>
5	Bg-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Proteus</i>
6	Bg-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Proteus</i>
7	Bg-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
8	Bg-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>Citrobacter</i>
9	Bg-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>Citrobacter</i>
10	Bg-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>Citrobacter</i>
11	Bg-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
12	Bg-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
13	Bg-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
14	Bg-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
15	Bg-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>

1-2-4- Prévalence des isolats identifiés par le portoir réduit de Leminor

Les résultats obtenus après l'identification des isolats par le portoir réduit de Leminor démontrent la dominance des *Escherichia coli* dans les isolements racinaires (40 %). Ils sont suivis par le genre *Klesbsiella* avec un taux de prévalence estimé à 26,66 % et du genre *Citrobacter* (20 %). Il est à noter aussi la présence du genre *Proteus* avec un taux estimé à 13,34 % (Figure 6).

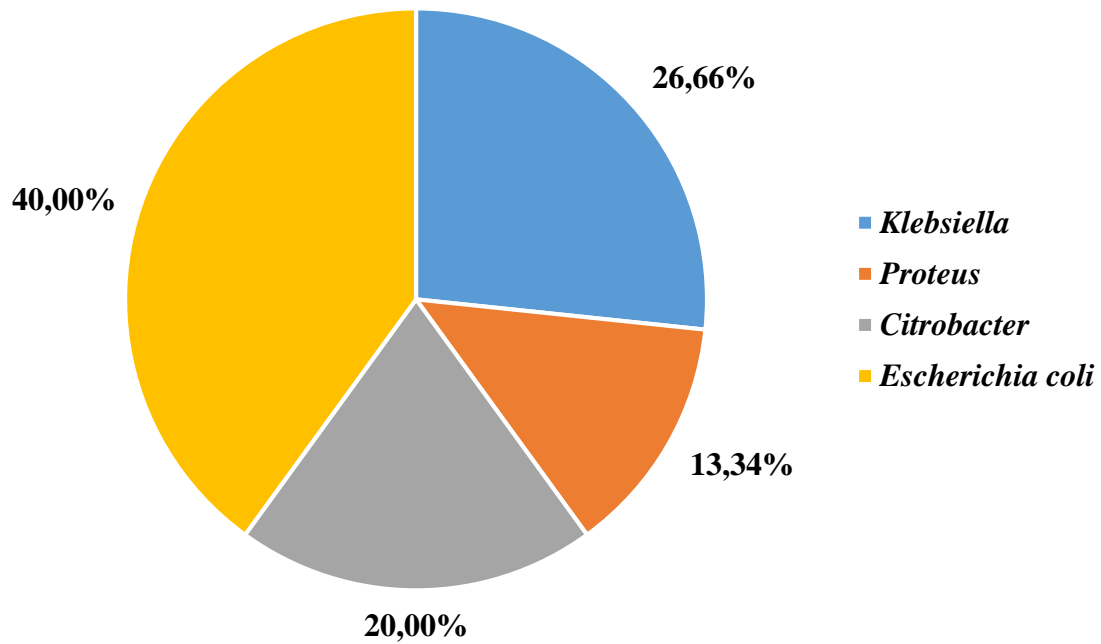


Figure 6: Répartition des isolats issus des racines

2- DISCUSSION

Les caractérisations macroscopiques, microscopiques et biochimiques observées au niveau des colonies isolées et purifiées nous ont permis d'identifier les différents microorganismes qui se trouvent dans les racines issues des sites contaminés par l'activité de l'orpaillage de Kokumbo.

De tailles petites ou moyennes, de formes rondes, muqueuses ou grisâtres produisant des pigments allant du jaune au vert a permis de dire qu'il s'agit vraiment des bactéries du genre *Pseudomonas*. Selon les travaux décrits par Schroth *et al.* (2006); Young, (2004), ces différentes caractéristiques macroscopiques observés sont généralement attribuées au groupe des *Pseudomonas*. La production d'un cytochrome C oxydase, de la catalase avec une mobilité par ciliature et la fermentation du glucose produisant du gaz montre qu'il s'agit de l'espèce *Pseudomonas spp.* Cette bactérie est de Gram- et ne produit pas d'indole. Elle n'utilise pas du mannitol et de lactose mais plutôt du citrate comme seule source de carbone. Leur présence dans l'environnement est due à leur faible exigence nutritionnelle (Alizadeh *et al.*, 2011).

Quant aux isolats de *Bacillus*, ils se présentent sous forme de colonies de taille moyenne avec un halo blanchâtre au centre. Il y a production de lécithine due au jaune d'œuf émulsionné incorporé dans la gélose de base. Malgré la diversité des colonies trouvées sur les boîtes de Pétri, les colonies du genre *Bacillus* ne sont pas difficiles à identifier (De Vos *et al.*, 2009). La non production de la cytochrome C oxydase, mais la catalase positive nous ont permis de dire qu'il s'agit effectivement de *bacillus spp.* Ce sont des bactéries Gram+ utilisant le citrate comme source de carbone et sont généralement mobiles. La morphologie de leurs colonies est très variable entre et au sein des espèces. La composition du milieu de culture et les conditions d'incubation influencent sur cette morphologie. Ce sont des bactéries capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfections et la dessiccation (De Vos *et al.*, 2009). Les *bacillus spp* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités étonnantes qui leur permettent de survivre dans les habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, halophiles (Awais *et al.*, 2007). Elles sont chimio-organotrophes et auxotrophes (De Vos *et al.*, 2009).

Les *Escherichia coli* forment des colonies violettes à rose avec des tailles moyennes et de formes rondes. Ce sont des bacilles droits ayant un diamètre de 0.3-1,8 µm. Les cellules prennent une coloration à Gram- étant immobiles ou mobiles. Elles sont de types oxydase négative et catalase positive, la plupart réduisant les nitrates (Avril *et al.*, 2000). Depuis l'apparition des cas d'intoxication par le mercure de la baie Minamata et de la maladie Itai-Itai

pour le cadmium, la sensibilité des bactéries aux métaux lourds est suivie régulièrement. Celle-ci varie, globalement, en fonction des sels de métaux lourds, des milieux de culture, des méthodes utilisées et du lieu d'isolement des souches bactériennes. Comme il n'existe pas de valeur stricte qui permet de différencier une souche résistante d'une souche sensible à un métal donné, Brocklehurst *et al.* (2000) ont étudié le profil de transcription du génome chez *E. coli* préalablement adaptée à des concentrations élevées de métaux lourds. En le comparant à celui de la souche sauvage, ces auteurs remarquèrent d'une part une augmentation du degré de transcription de certains gènes associés fonctionnellement aux métaux lourds (Ni₂₊ export, chélate-Fe export, biotine sulfoxyde réductase). D'autre part, une diminution de gènes (stimulateur de translation, putative pseudouridylate synthase) impliqués potentiellement dans la translation de gènes codant pour la tryptophanase et l'aspartase, ainsi que des gènes qui codent pour les porines de la membrane externe. Kanwal *et al.* (2004) ont testé la résistance de souches d'*E. coli* et de *Bacillus* au plomb et à d'autres métaux. Ces auteurs ont remarqué que les souches d'*E. coli* étaient capables de croître à des concentrations de Plomb atteignant 8 ppm et d'autres métaux. Harnett & Gyles (1984) ont rapporté que pour les souches d'*E. coli*, la résistance au mercure est véhiculée par un même plasmide qui code pour la multi résistance aux métaux lourds. En s'intéressant à la décontamination des sols industriels, militaires et miniers pollués par des métaux lourds, Stephen *et al.* (1999) ont étudié la supplémentation des sols par un mélange de métaux à l'état de chlorures et son influence sur la structure et la taille des bactéries oxydant les ions ammoniums (sous-groupe β des protéobactéries) en présence et en absence d'inoculation par des bactéries hétérotrophes résistants aux métaux. Les résultats montrent un changement de la structure de la population de bactéries oxydant les ions ammonium en présence des métaux. L'ajout d'un inoculum de bactéries résistantes aux métaux abolit ce changement de structure de la population.

Les *Staphylococcus aureus* observés sont des bactéries de petites tailles ou de tailles moyennes variant de 0.7 à 2 μ m de diamètre et de couleurs noires. Cette espèce peut proliférer en présence des métaux lourds dans un site contaminé. Les souches de *Staphylococcus aureus* utilisées sur un site pollué ont montré une croissance prononcée en présence du mercure à 37 °C (Kondo *et al.*, 1974).

L'observation microscopique permet d'apprécier des bacilles courts de couleur rose, à Gram négatif. Les rhizobiums sont des bactéries du sol, strictement aérobies possédant une forme bâtonnet mobile de 0,6 à 0,9 μ m de largeur et de 1,2 à 3 μ m de longueur avec un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles périt riches (Gage, 2004). Elles sont des bacilles Gram négatif et elles ne font pas d'endospores (Jordan, 1984 ; Beck *et al.*, 1993). Ces méthodes de

caractérisation morphologique auxquelles on a eu recours sont également utilisées par Menna *et al.* (2006) ; Pinto *et al.*, (2007) ; Wei *et al.*, (2008) dans des études antérieures pour caractériser des souches isolées à partir des nodules de légumineuses.

L'utilisation des bactéries comme biosorbants a été largement étudiée par plusieurs chercheurs. La biomasse microbienne est une alternative potentielle pour l'absorption des métaux lourds provenant des milieux contaminés. Les avantages inhérents à la bioremédiation par les microbes sont que la biomasse microbienne (Par exemple, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* etc.) peut être acquise comme un produit résiduel semblable aux industries de fermentation et que les bactéries peuvent absorber une quantité importante d'ions de métaux lourds ce qui entraîne le transfert de métaux vers une matrice de biomasse contaminée (Arivalagan *et al.*, 2014 ; Dhanarani *et al.*, 2016). Parmi les microorganismes, les bactéries ont des mécanismes génétiques spécifiques et jouent un rôle important dans l'atténuation de la contamination de l'environnement. Certaines souches bactériennes importantes telles que *Bacillus* et *Pseudomonas spp* ont été largement utilisées pour éliminer les métaux lourds des eaux usées et du sol en raison de leurs fortes affinités de liaison aux métaux (Arivalagan *et al.*, 2014; Bachate *et al.*, 2013; K.L & Ramakrishna, 2011; Ulah *et al.*, 2015).

La paroi cellulaire microbienne est principalement responsable de la fixation des métaux lourds (Siddique *et al.*, 2015). La nature anionique des surfaces microbiennes leur permet de fixer les cations métalliques par des forces électrostatiques. Les bactéries à Gram positif contiennent une paroi cellulaire plus épaisse, composée de peptidoglycane, d'acides teichoïques et teichuronique. Chez les bactéries à Gram négatif, les acides teichoïque et teichuronique sont absents et la couche de peptidoglycane est mince. Par rapport aux bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif sont plus efficaces pour piéger les ions métalliques. Le rôle prépondérant des composants de la surface des cellules bactériennes dans la biosorption a été mise en évidence par les découvertes de Karthik (Karthik *et al.*, 2017).

À l'exception des bactéries, il est aussi évident d'utiliser les champignons filamenteux pour dépolluer un site contaminé (Saratale *et al.*, 2007), car ils sont bien connus pour tolérer et détoxifier les effluents contaminés par les métaux lourds. Le mécanisme impliqué dans la détoxification fongique d'un environnement contaminé par les métaux lourds comprend la transformation de la valence des précipitations intra et extracellulaire ainsi que l'absorption active (Thatoi *et al.*, 2014).

Conclusion et perspectives

Les microorganismes occupent, de plus en plus, une place importante dans la dépollution et la bioremédiation d'un site contaminé par les métaux lourds. C'est pourquoi leur isolement à partir des racines, nodules et leur identification font l'objet d'étude d'intenses recherches.

Dans un premier temps nous avons réussi à isoler quelques souches de *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus* et de *Rhizobiums*. Ces souches ont fait l'objet, dans un second temps, d'une étude macroscopique, microscopique et biochimique afin de bien caractériser les microorganismes isolés. Les résultats obtenus ont montré qu'en fonction des caractérisations macroscopique, microscopique et biochimique observés, les microorganismes isolés sont effectivement des souches recherchées pour la dépollution et bioremédiation des sites pollués.

Il s'avère nécessaire de mentionner que ces résultats ouvrent large, les perspectives pour des autres recherches sur ces souches et leurs applications en bioremédiation, tel que la possibilité d'optimisé un milieu favorable pour utiliser ces microorganismes à grande échelle dans les stations d'épuration des sols par des bioréacteurs. Ainsi, il serait intéressant d'étudier les autres caractères de ces souches tels que la résistance à la radiation ionisante et les valorisés dans des applications biotechnologique. Enfin, ces souches identifiés pouvaient être conservés pour une utilisation à long terme.

Références

- Ahemad, M. & Kibret, M. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science* 26(01): 1-20.
- Amutabi, M. and Lutta-Mukhebi, M. (2001). Gender and mining in Kenya: The case of the mukibira mines in the Vihiga district. *Jenda: A Journal of Culture and African Women's Studies*, 1(2):1–23.
- Anonyme. (2021). Rhizosphère : Définition, composition et importance. [En ligne]. <http://www.projetecolo.com> [Consulté le : 20-07-2022].
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F. & Monteil H., 2000. Bactériologie clinique, Ellipses 2ième édition, Paris, France, 602 p.
- Azapagic A. (2004). Developing a framework for sustainable development indicators for the mining and minerals industry. *Journal of Cleaner Production*, 12: 630-662.
- Balzergue, C. (2012). Régulation de la symbiose endomycorhizienne par le phosphate. Biologie végétale. Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2012. *Plant Signaling & Behavior* 6(6): 838p.
- Banchirigah S. & Hilson G. (2010). De-agrarianization, re-agrarianization and local economic development: re-orienting livelihoods in African artisanal mining communities. *Policy Sciences*, 43: 157-180.
- Banchirigah S. (2006). How reforms have fuelled the expansion of artisanal mining? Evidence from sub-Saharan Africa, *Resources Policy*, 31 (3): 164-171.
- Bantenga, M. (1995). L'or des régions de Poura et de Gaoua: Les vicissitudes de l'exploitation coloniale, 1925-1960. *The International Journal of African Historical Studies*, 28(3):563–576.
- Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (Actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat en Biologie. Paris : Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen , Paris, France, 90 p .
- Beneduzi, A. Ambrosini, A. & Passaglia, Luciane M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol*, 35(4 Suppl): 1044-1051.
- Brocklehurst K. R and A. P. Morby. 2000. Metal-Ion Tolerance in *Escherichia coli*: Analysis of Transcriptional Profiles by Gene-Array Technology. *Microbiology*, 146: 2277-2282.
- Chauveau J. P. (1979). “Les cadres socio-historiques de la production dans la région de Kokumbo (pays Baoulé, Côte d'Ivoire), Cahier ORSTOM sciences humaines, Bondy (France), 143 p.

- Chedly A. (2002). Bio-remédiation/Phyto-remédiation département des sciences naturelles, Université de Tunis, Tunis, Tunisie, Rapport, 32 p.
- De Vos P., Garrity G. R., Jones D., Kreig N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H & Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, the firmicute. Springer. New York, USA, *Bergey's Manual of Systematic 3*: 63-67.
- Dondeyne S. & Ndunguru E. (2009). Artisanal mining in Central Mozambique: policy and environmental issues of concern. *Resources Policy*, 34(1-2): 45–50.
- Gagnon, Y. (2015). Le sol et les processus naturels de nutrition des plantes. Association Manger Santé Bio. [En ligne]. <http://www.mangersantebio.org/18623/le-sol-et-les-processus-naturels-de-nutrition-des-plantes> [consulte le 25-04-2017].
- Gans J., Wolinsky M., Dunbar J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309: 1387-1390.
- García Lucas, J.A., Schloter, M., Durkaya, T., Hartmann, A. & Gutierrez-Maero, F.J. (2003). Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biol Fertil Soils* 37(6): 381-385.
- Garvin T., McGee T. K., Smoyer-Tomic K. E. & Aubynn E. A. (2009). Community– company relations in gold mining in Ghana. *Journal of environmental management*, 90(1): 571– 586.
- Gobat, J. M., Aragno, M. & Matthey, W. (2010). Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols 3^{ème} édition, PPUR Presses polytechniques, 817 p.
- Harnett N.M. & Gyles C. L. (1984). Resistance to Drugs and Heavy Metals, Colicin Production, and Biochemical Characteristics of Selected Bovine and Porcine *Escherichia coli* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 930-935.
- Hinton, J., Veiga, M. M., and Beinhoff, C. (2003). *Women and Artisanal Mining: Gender Roles and the Road Ahead*, chapter The Socio-Economic Impacts of Artisanal and Small-Scale Mining in Developing Countries. AA Balkema, Sweets Publishers.
- Institut Nationale de la Statistique (2014). “Recensement Général de la Population et de l’Habitat (RGPH) : Données socio démographiques et économiques, Région du Béliér” Yamoussoukro, Côte d’Ivoire, 76 p.
- Iwai Y. & Takahashi Y. (1992). "Selection of microbial sources of bioactive compounds" in «The search for bioactive compounds from microorganisms», Springer Verlag, 63: 281 -302.
- Kiethaga, J. B. (1983). *L’or de la Volta Noire*. Centre de Recherches Africaines.
- Kitula A. G. (2006). The environmental and socio-economics impacts of mining on local livelihoods in Tanzania: A case of Geita district. *Journal of Cleaner Production*, 14 (3-4): 405–414.

- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. & Zhang, S.A. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology* 94(11):1259-1266.
- Kondo I., Ishikawa T. & Nakahara H. (1974). Mercury and Cadmium Resistances Mediated by the penicillinase Plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 117:1-7.
- Kozdrój J. & van Elsas J. D. (2001). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 43:197-212.
- Labonne, B. (1996). Artisanal mining: an economic stepping stone for women. *Natural Resources Forum*, 20(2):117–122.
- Lévy, E., Eyal, Z., Chet, I. & Hochman, A. (1992). Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 40(3):163-71.
- Leyval, C. (2008). Les organismes du sol au service de la bioremédiation. LIMOS UMR 7137 Université de Nancy, CNRS, faculté des sciences.01P.
- Longfei Z., Zhenshan D., Wenquan Y., Ying C., Entao W. & Gehong W. (2010). Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(8): 468-477.
- Madigan M. & Martink J. (2007). Brock Biologie des microorganismes 11e edition. Person Education France, Lille, France, 11: 599 -601.
- Maponga, O. & Ngorima, C. F. (2003). Overcoming environmental problems in the gold panning sector through legislation and education: the zimbabwean experience. *Journal of Cleaner Production*, 11(2): 147–157.
- Marchal N. Bourdon J.L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin éditeurs, Paris, France, 509 p.
- Marchall, N., Bourdon, J.L. & Richard, C. (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Dion, Paris.
- Mézaache, S.A., Haichour, N., Guechi, A. & Zerroug, M. (2016). Bacteriocins Contributing in Rhizospheric Competition among Fluorescent *Pseudomonas*. *Annual Research & Review in Biology* 11(4): 1-9.
- Ministère de l'Industrie et des Mines. (2013). Programme national de rationalisation de l'orpaillage en Côte d'Ivoire (PNRO), 3 p.
- Morel J. L., Habib L., Plantureux S. & Gucker A. (1991). Influence of maise root on soil aggregates stability. *Plant and Soil*. 136(1): 111-119.

- Ndela K. J. (2008). “Les activités minières et la fiscalité : Cas de la République Démocratique du Congo”, Thèse de doctorat en Droit, Administration et Secteur Public. Université Paris I Panthéon - Sorbonne, Paris, France, 500 p.
- Nedwell D. B. (1999). Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 101-111.
- Ngumbi, E., Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology* 105(2016): 109-125.
- Noetsaller, R. (1987). Small scale mining: a review of the issues. *World Bank*.
- Paskiewicz I. (2006). Incidences d’interaction racines-microorganismes-état hydrique sur la mobilisation et redistribution de métaux dans des sols nickélicifères. Thèse de doctorat en Sciences du sol-Géomicrobiologie : Université Henri Poincaré, Nancy I. France, 237 p.
- Pelmont, J. (1995). Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. *Office des Publications Universitaires*, 2: 541-572.
- Reddy, M.S., Ilaio, R.I. & Faylon, P.S. (2014). Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) for Sustainable Agriculture, Cambridge Scholars Publishing. 540p.
- Richardson, A.E., Baréa, J. M., McNeill, A.M. & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321(1): 305-339.
- Romdhane Marwa (2010), Immobilisation des bactéries isolées à partir des zones minières sur des supports polymériques pour la bioremédiation, Mémoire de projet de mastère soutenu à Sidi Thabet, 49 pages: 2.
- Sandaa R., Enger A. & Torsvik V. (1999). Abundance and Diversity of Archaea in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3293-3297.
- Sangaré O. (2016). Rôle de l’orpaillage dans le système d’activités des ménages en milieu agricole: cas de la commune rurale de Gbomblora dans la région Sud-Ouest du Burkina Faso. Master’s thesis, 54 p.
- Satchanska G., Pentcheva E. N., Atanasova R., Groudeva V., Trifonova R. & Golovinsky E. (2005). Microbial Diversity in Heavy-Metal Polluted Waters. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19: 61-67.
- Schardl C. L., Leuchtman A. & Spiering M. J. (2004). Symbioses of grasses with seed-borne fungal endophyte. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 315-340.
- Telmer K. H. & Veiga M. M. (2009). World emissions of mercury from artisanal and smallscale gold mining. In Mercury Fate and Transport in the Global Atmosphere, *Springer*, 25: 131-172.

- Vacheron, J., Desbrosses, G & Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, *Front Plant Sci.* 4(356): 1-19.
- Wei w. Afr J. & Altern M. (2014). YCF1 mediated cadmium resistance in yeast is dependent on copper metabolism and antioxidant enzymes. *Antioxid redox signal* 21(10): 1475-1489.
- Werthmann K. (2003). Translocality: the study of globalising processes from a southern perspective, chapter 'Following the hills': Gold mining camps as heterotopias, *Journal of International Development*, 23(8): 111-132.
- Yang, C.H. & Crowley, D.E. (2000). Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status. *Appl Environ Microbiol* 66(1): 345-351.

RESUME

L'économie de la Côte d'Ivoire qui d'antan était essentiellement basée sur le développement du secteur agricole et de sa productivité est depuis quelques décennies tournée vers l'exploitation des ressources minières tel que l'or à cause de la forte hausse de son prix atteignant plus de 1600 dollars l'once. Cependant même si l'orpaillage participe au développement économique local, son impact sur l'environnement est indésirable. Le présent travail a pour objectif général d'évaluer et caractériser les microorganismes présents sur les racines et les nodules issus du site d'orpaillage de Kokumbo et qui ont une activité de bioremédiation propice pour l'agriculture. Après leur isolement, les souches ont été caractérisées et identifiées. Soixante-deux (62) souches ont été purifiées et caractérisées en utilisant des approches phénotypiques. Les résultats ont montré la présence de genres *Bacillus*, *Clostridium*, *staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* avec une dominance du genre *Escherichia coli* et d'autres dont les tests effectués sont insuffisants pour leur identification. En définitive, le défi le plus important à présent, c'est d'être capable de valoriser ces souches afin de bien effectuer une activité de bioremédiation propice pour l'agriculture.

Mots clés : Orpaillage, microorganismes, bioremédiation, agriculture

ABSTRACT

The economy of Côte d'Ivoire, which in the past was essentially based on the development of the agricultural sector and its productivity, has for several decades been oriented towards the exploitation of mineral resources such as gold because of the strong increase in its price reaching more than 1600 dollars per ounce. However, even if gold panning contributes to local economic development, its impact on the environment is undeniable. The general objective of this work is to evaluate and characterize the microorganisms present on the roots and nodules from the Kokumbo gold panning site and which have a bioremediation activity suitable for agriculture. After their isolation, the strains were characterized and identified. Sixty two (62) strains were purified and characterized using phenotypic approaches. The results showed the presence of *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* genera with dominance of the *Escherichia coli* genus and others for which the tests carried out are insufficient for their identification. Ultimately, the most important challenge is to be able to valorize these strains in order to properly carry out a bioremediation activity suitable for agriculture.

Keywords: Gold panning, microorganisms, bioremediation, agriculture