Optimisation du processus de Phytoextraction: étude de la diversité bactérienne du sol d'une plante hyperaccumulatrice *Arabidopsis halleri*

BARILLOT Cindy - cindy.barillot@ineris.fr

Directeur : Nelly **COCHET** - UTC, EA 4297, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France

Thèse suivie à l'INERIS par Valérie **BERT** – Direction des Risques Chroniques – Pôle Risques et technologies durables – Technologies et procédés propres et durables (TPPD) - Autres encadrants : Claude-Olivier **SARDE** - UTC, Compiègne et Eric **TARNAUD** – INERIS - TPPD

Contexte

Les phytotechnologies sont des techniques de gestion des sites et sols pollués faisant appel aux plantes et aux microorganismes associés. La phytoextraction, consiste en l'utilisation de plantes ayant la capacité d'accumuler de fortes teneurs en polluants métalliques dans leurs parties aériennes récoltables (tiges et feuilles) pour dépolluer une matrice polluée.

La plante idéale en phytoextraction devrait théoriquement répondre à quatre critères: 1/ produire beaucoup de biomasse, 2/ avoir une vitesse de croissance élevée, 3/ avoir une forte capacité d'accumulation et 4/ être tolérante aux concentrations métalliques du sol. Aucune plante connue ne présente l'ensemble de ces caractéristiques.

Deux stratégies sont ainsi à l'étude : 1/ l'utilisation de plantes ligneuses (*Populus, Salix*) présentant une forte production de biomasse et une croissance très rapide mais une accumulation modérée ou 2/ l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices appartenant essentiellement à la famille des Brassicacées (*Arabidopsis, Thlaspi*), et présentant une tolérance à des concentrations métalliques très élevées mais qui ont le désavantage de produire peu de biomasse.

Des études récentes ont montré que certains microorganismes présents dans les sols sont capables d'augmenter la mobilité des métaux par la production de biosurfactants, sidérophores et acides organiques *(Lebeau et al., 2008)*. Cette meilleure biodisponibilité favoriserait un meilleur prélèvement de ces métaux par les racines et donc des concentrations en métaux plus élevées dans la plante. En outre, la présence de PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) permettrait d'augmenter la biomasse des plantes de manière significative *(Zhuang et al., 2007)*. Ces travaux permettent de supposer que la maîtrise des communautés bactériennes du sol constitue une voie d'approche potentielle de l'amélioration de la phytoextraction.

Objectif

L'objectif principal du projet OPHYTO est d'étudier la diversité bactérienne au voisinage d'une plante hyperaccumulatrice, *Arabidopsis halleri* et de déterminer les bactéries candidates pour augmenter la biomasse de la plante et/ou son accumulation en métaux. Cette plante possède la capacité physiologique naturelle d'accumuler des concentrations très importantes de zinc (>10 000 mg kg^{-1} poids sec) et de cadmium (> 100 mg kg^{-1} poids sec).

Matériel / Méthodes

L'étude a été réalisée à partir d'un sol industriel contaminé en zinc et en cadmium (Auby, Nord Pas de Calais). Divers points de prélèvement respectant un gradient de contamination du sol ont été assignés. L'échantillonnage a été conduit en s'efforçant de séparer différentes fractions de sol relativement à leur distance de la plante permettant ainsi d'envisager trois microcosmes supposés distincts : global, rhizosphère et rhizoplan (du plus éloigné au plus proche de la racine).

Afin d'évaluer la diversité des microcosmes isolés, une extraction d'ADN total, suivie d'une amplification en PCR du gène codant pour l'ADN ribosomique 16S présent au sein des populations bactériennes résidentes ont été réalisées. Les amplicons obtenus sont actuellement en cours de clonage et d'analyses par RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Le séquençage des clones les plus représentatifs devrait permettre d'identifier les espèces bactériennes les plus intéressantes, parmi lesquelles certaines sont susceptibles d'être associées à des rendements élevés en phytoextraction.

Une seconde partie des travaux est dédiée à l'étude des bactéries cultivables présentes dans ces mêmes sols. Une partie de ces bactéries a déjà été isolée et est en cours de caractérisation. Les résultats obtenus seront confrontés à ceux de l'identification moléculaire afin de déterminer parmi les souches potentiellement impliquées dans la production de biomasse et/ou dans l'accumulation du Zn et Cd dans la plante celles qui sont les plus aptes à être des promoteurs efficaces de phytoextraction.

Une troisième partie consistera en l'inoculation des bactéries sélectionnées précédemment afin de mettre en évidence, par la mesure de différents paramètres, une augmentation des capacités accumulatrices d'*Arabidopsis halleri* et/ou une stimulation de sa croissance (bioaugmentation). Les résultats attendus sont la mise en évidence d'une ou plusieurs souches bactériennes cultivables susceptibles d'être utilisées conjointement avec *Arabidopsis halleri* pour la bioremédiation de sols pollués en Zn et Cd.

Avancement des travaux / Résultats

Actuellement, la mise au point du protocole d'échantillonnage des trois fractions de sols a été effectuée. Le comptage des bactéries cultivables sur milieu de culture LB ainsi que l'isolement des différentes souches ont été réalisés. Les résultats du dénombrement bactérien ont permis de mettre en évidence que la flore bactérienne est influencée à la fois par le niveau de pollution métallique et par la proximité à la racine. En effet, plus la pollution en métaux est élevée, plus le nombre de bactéries cultivables diminue. La proximité à la racine semble quant à elle, avoir un impact positif sur la densité bactérienne : la densité bactérienne augmente avec la proximité à la racine.

L'étude de la diversité bactérienne à l'aide d'outils de biologie moléculaire a été initiée. Les amplicons du gène 16S ADNr ont été obtenus par PCR pour les neufs échantillons de sol. La seconde étape, consistant en la création d'une librairie de clones, suivie d'une analyse en RFLP, est en cours d'élaboration.

Perspectives

Au cours des mois à venir, nous poursuivrons l'analyse de la diversité bactérienne à l'aide d'outils d'empreinte moléculaire et les profils majoritaires seront séquencés. Les bactéries cultivables seront identifiées et des tests de mesures des caractéristiques PGPB seront mise en place. Les bactéries potentiellement intéressantes pour les essais de bioaugmentation seront sélectionnées.

Enfin, nous débuterons les essais de bioaugmentation c'est-à-dire d'inoculation de bactéries d'intérêts dans des pots *d'Arabidopsis halleri* sous conditions contrôlées.

Communications

Cindy BARILLOT, Bert Valérie, Sarde Claude-Olivier, Cochet Nelly– Conférence Internationale Final COST ACTION 859 – « Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety » - Ascona, Suisse – 12 au 16 octobre 2009 - Poster

Remerciements

Le programme OPHYTO est financé par la Région Picardie. Cindy Barillot est financée par l'INERIS et l'ANRT.

References

Lebeau T., Braud A., and Jézéquel K., 2008 *"Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review"*. Environmental Pollution, 153, 497-522

Zhuang X., Chen J., Shim H., and Bai Z., and al., 2007 *"New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation"*. Environment International, 33, 406-413