

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى- جيجل



Faculté : Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Microbiologie Appliquée et

Sciences Alimentaires

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم: الميكروبيولوجيا التطبيقية

وعلوم التغذية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Isolement de quelques bactéries lactiques tolérantes au cuivre à partir du lait et dérivés pour une éventuelle application en bioremédiation

Membres de Jury :

- **Présidente** : Dr Laïb Essaid
- **Examinatrice** : Dr Amira Samiya
- **Encadreur** : Pr Ouled Haddar Houria

Présenté par :

M^{elle} Boultif Yousra
M^{elle} Zeghouani Cheyma

Année Universitaire 2020 – 2021

Numéro d'ordre (bibliothèque) :



Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" qui nous'a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail, merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nous remercions très sincèrement et très chaleureusement notre encadreur **Pr. Ouled Haddar Houria** pour avoir accepté de nous encadrer et de nous accompagner, pas à pas à travers sa disponibilité, ses orientations et ses conseils pertinents qui ont grandement facilité ce travail.*

*Nous tenons à remercier également l'ensemble des membres du jury **Dr Laïb Essaid** et à **Mme Amira Samiya** examinatrice qui ont accepté d'évaluer notre travail.*

*Nos remerciements aussi pour **Madame Roula Hanane** de nos avoir apporté toute l'aide possible dans ce travail.*

Enfin toute notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.



Dédicace

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur : Mes parents **Moussa** et **Nadia** qui je ne pourrai pas à toute ma vie de rendre une partie de leur labour.*

*A mes frères **Imad** et **Adel**, A mes belles sœurs **Loubna**, **Rim** et leurs enfants.*

A toutes ma famille.

*A **Cheyma Zeghouani** chère amie avant d'être binôme.*

*A mes chères amies **Zineb Hamdellou**, **Meriem Meshoul**, **Sara Siwala**, **Ines Bouldjedri** et **Aziza Bousmid**.*

A tous ceux qui m'ont soutenu pour devenir qui je suis.

A mes collègues : promotion de Microbiologie appliquée 2021.

Yusra

Dédicace



*A ma mère qui nous a quitté en le douloureux été 2009, toi dont la sagesse et générosité sont sans limite, c'est à Allah que nous appartenons et c'est vers Lui que nous retournerons, repose en paix cher **mama Zoulikha**.*

*A **mon père** qui mon tout donné, qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau, Allah vous protège et vous donne la santé et longue vie.*

A vous à qui ma principale préoccupation est de vous rendre aux centuples tous ce que vous m'avez offert, celles qui sans elles je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui, Quoi que je face, je ne pourrais vous rendre ce que vous avons fait pour moi.

*A ma **grand-mère** et mon oncle **Ibrahim** mes sources de vie.*

A mes frères et sœurs que je prends toujours en exemple qui m'ont donné le courage pour le succès dans la vie.

A toute ma famille

*A mon binôme **Yusra Boultif** qui m'a accompagné dans ce travail et qui a surmonté toutes les difficultés ensemble, ma source de mon sourire, je t'aime.*

*A mes proches amis **Amel Djerdir**, **Degui Djaffar** et **Foued Boutebakh** qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes coté, et qui m'ont accompagné durant mon chemin.*

*A mes adorables amis **Nazihia Kennar**, **Nada Laouer**, **Fatima Meradji** et la fille aux yeux verts **Fatine Zouaghi**.*

A mes camarades de la promotion à toute personne qui m'a aidé à franchir un horizon dans ma vie.

Cheyma



Listes des abréviations	IV
Listes des figures et photos	V
Listes des tableaux	VII
Introduction.....	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	
I. Les sources de cuivre.....	3
II. Pollution environnementale par le cuivre.....	3
II.1. Pollution du sol.....	4
II.2. Pollution de l'air.....	4
II.3. Pollution de l'eau.....	4
III. Toxicité du cuivre sur la chaîne alimentaire	5
III.1. Toxicité du cuivre sur l'Homme	5
III.2. Toxicité sur les microorganismes.....	6
III.3. Impact du cuivre sur le milieu aquatique	6
III.4. Impact du cuivre sur les plantes	6
IV. Normes et réglementations Algériennes et mondiales.....	7
V. Elimination du cuivre.....	8
V.1. Procédés physico-chimiques	8
V.1.1. Cémentation	8
V.1.2. Précipitation	9
V.1.3. Adsorption	9
V.2. Bioremédiation	10
V.2.1. Relation microorganisme / plante à l'égard du cuivre.....	10
V.2.2. Phytoremédiation	10
VI. Tolérance des bactéries lactiques au cuivre.....	11
VI.1. Bactéries lactiques et cuivre.....	11
VI.2. Mécanismes de tolérance des bactéries lactiques au cuivre.....	11
VI.2.1. La biosorption.....	12
VI.2.2. L'accumulation.....	12
VI.2.3. La séquestration.....	12
VI.2.4. L'efflux actif.....	12
VI.2.5. La détoxification enzymatique	12
VII. Application des bactéries lactique tolérantes au cuivre en bioremédiation.....	14

Matériels et Méthodes

I. Matériel.....	16
I.1. Matériel biologique.....	16
I.2. Milieux de culture.....	16
I.3. Produits chimiques et réactifs.....	16
I.4. Appareillage.....	17
II. Méthodes.....	18
II.1. Isolement des bactéries lactiques.....	18
II.1.1. Préparation des solutions mères.....	18
II.1.2. Isolement des bactéries lactiques (BL).....	18
II.1.3. Screening et purification des souches lactiques tolérantes au cuivre.....	18
II.2. Identification partielle des BL isolées.....	18
II.2.1. Critères morphologiques.....	19
II.2.2. Critères physiologiques et biochimiques.....	19
II.2.2.1. Revivification des souches.....	19
II.2.2.2. Test de la catalase.....	19
II.2.2.3. Type fermentaire.....	19
II.2.2.4. Croissance à différentes températures.....	20
II.2.2.5. Croissance en présence de NaCl.....	20
II.3. Screening des bactéries lactiques tolérantes au cuivre.....	20
II.3.1. Criblage primaire des souches productrices d'EPS.....	20
II.3.2. Production des EPS.....	20
II.3.3. Extraction des EPS.....	21
II.3.4. Quantification des EPS.....	21
II.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du cuivre.....	21
II.5. Test d'élimination du cuivre.....	22

Résultats et discussion

I. Identification des isolats.....	23
II. Critères morphologiques.....	23
II.1. Macroscopiques.....	23
II.2. Microscopiques.....	23
III. Caractères physiologiques et biochimiques.....	25
III.1. Test de la catalase.....	25
III.2. Type fermentaire.....	25

III.3. Croissance à différentes températures	25
III.4. Croissance en présence de NaCl	25
IV. Screening des souches résistantes au cuivre	28
IV. Screening des souches bactériennes productrices des EPS	34
V. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	36
VI. Test d'élimination du cuivre	39
Conclusion	42
Références bibliographiques	43
Annexes.....	VIII

ACC : Arsenic chrome cuivre.

BL : Bactéries lactiques.

CEE : Communauté économique européenne.

CMI : Concentration minimal inhibitrice.

CIAPOL : Centre ivoirien antipollution.

Cu-AtPase : Adénosine triphosphatase de cuivre.

DO : Densité optique.

DJA : Dose journalière admissible

EPS : Exopolysaccharide.

GRAS : Generally Recognized As Safe.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide.

noxA : NADH-oxydases A.

noxB : NADH-oxydases B.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ppm : Partie par million (10^{-6}).

ROS : Espèces réactives d'oxygène.

rpm : Rotation par minute.

SAA : Spectrophotométrie à absorption atomique.

Tr/mn : Tour par minute.

UFC : Unité formant colonie.

μ : Taux de croissance.

Liste de figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Réduction du cuivre chez <i>Lactococcus lactis</i>	13
Figure 2	Modèle actuel de l'homéostasie du cuivre chez <i>B. subtilis</i> , y compris les composants fonctionnels pour l'absorption et l'efflux du cuivre ainsi que leur répresseur apparenté.	14
Figure 3	Distribution de pourcentage des isolats lactiques tolérants de cuivre	27
Figure 4	Cinétique de croissance de la souche LS2 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	28
Figure 5	Cinétique de croissance de la souche R22 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	28
Figure 6	Cinétique de croissance de la souche N5 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	29
Figure 7	Cinétique de croissance de la souche LGS1 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	29
Figure 8	Cinétique de croissance de la souche L21 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	29
Figure 9	Cinétique de croissance de la souche R16 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	30
Figure 10	Cinétique de croissance de la souche R15 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	30
Figure 11	Cinétique de croissance de la souche Lb41 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	30
Figure 12	Cinétique de croissance de la souche L30 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	31
Figure 13	Cinétique de croissance de la souche ANS3 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	31
Figure 14	Cinétique de croissance de la souche L23 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .	31
Figure 15	La quantité des EPS (mg/l) des trois souches lactiques isolées du lait et dérivés sur bouillon hypersaccharosé.	35
Figure 16	Evolution de la concentration du Cu dans le temps et cinétique de la croissance de la souche LGS1 dans le bouillon MRS en présence (50mg/l) du Cu.	39
Figure 17	Evolution de la concentration du Cu dans le temps et cinétique de la croissance de la souche Lb41 dans le bouillon MRS en présence (50mg/l) du Cu.	39
Figure 18	Evolution de la concentration du Cu dans le temps et cinétique de la croissance de la souche R15 dans le bouillon MRS en présence (50mg/l) du Cu.	40

Liste des photos

N°	Titre	Page
Photo 1	Observation macroscopique des colonies lactiques sur gélose MRS.	23
Photo 2	Observation macroscopique de la bactérie lactique (ANS3) après purification	23
Photo 3	Observation microscopique (Objectif X100) de la souche lactique, LS2, isolée du lait, après coloration de Gram.	24
Photo 4	Observation microscopique (Objectif X100) de la souche lactique, R 22 , isolée de Raib après coloration de Gram.	24
Photo 5	Aspect des colonies de quelques souches lactiques sur gélose hypersaccharosée	34

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 01	Sources naturelles et anthropiques de cuivre	3
Tableau 02	Valeurs de cuivre dans différents sites d'Annaba en Algérie	5
Tableau 03	Normes et réglementation Algérienne et mondiale de cuivre dans l'eau et la chaîne alimentaire.	7
Tableau 04	Critères macroscopiques et microscopiques des souches lactiques isolées.	24
Tableau 05	Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques isolées du lait et dérivés.	26
Tableau 06	Différents groupes des bactéries lactiques isolées du lait et dérivés.	27
Tableau 07	Taux de croissance(μ) des onze souches en présence et en absence de Cu^{+2} .	32
Tableau 08	Résultats du test de production des EPS sur gélose hypersaccharosée.	35
Tableau 09	Détermination de la CMI de la souche Lb41.	37
Tableau 10	Détermination de la CMI de la souche R15.	37
Tableau 11	Détermination de la CMI de la souche LGS1.	38

Introduction

Les métaux lourds dans l'environnement sont des composants naturels de la croûte terrestre. Ils sont trouvés dans le sol à faibles concentrations sous formes solubles ou insolubles et ils peuvent être absorbés par les plantes ou retenus par les sols (**Ogbonna et al., 2013 ; Xu et al., 2014**)

Au cours des dernières décennies, des niveaux toxiques de métaux lourds dans l'air, l'eau, le sol, les plantes et les animaux ont été signalés dans le monde entier. De plus, le cuivre (Cu) dans l'environnement mérite une attention particulière car il est l'un des éléments métalliques nécessaire pour l'Homme et il maintient la fonction corporelle normale comme micronutriments. (**Ahmed et al., 2005 ; Cheraghi et al., 2011 ; Usman et al., 2012**).

Le Cu peut également être classé comme oligoélément essentiel qui est requis par les organismes en quantités non excessives pour assurer les fonctions physiologiques et biochimiques vitales. Cependant, il peut contaminer l'environnement en tant que polluant potentiellement toxique pour les organismes vivants lorsqu'il est présent à haute concentration. Comme pour les autres métaux lourds, sa menace est aggravée par sa persistance à long terme dans l'environnement (**Ahmed et al., 2005 ; Cloutier et al., 2009 ; Soro et al., 2009 ; Bigalke et al., 2011 ; Cheraghi et al., 2011 ; Usman et al., 2012 ; Jaouen et al., 2013 ; Colombo et al., 2019 ; Ghuniem et al., 2019 ; Zeng et Han, 2020**).

Les méthodes conventionnelles disponibles (précipitation, adsorption...) pour l'élimination du cuivre même à faible concentration sont considérées comme coûteuses et inefficaces et peuvent provoquer des impacts négatifs sur l'environnement. Généralement, il n'existe pas de procédé économiquement rentable permettant une réutilisation des matériaux contaminés (**Halttunen et al., 2007**).

En revanche, le besoin en nouvelles techniques, économiquement compétitives et pouvant préserver les caractéristiques des écosystèmes est urgent. Ces techniques regroupées sous le terme générique de bioremédiation font appel ; soit à des plantes soit à des microorganismes pour aboutir à la restauration des milieux pollués (**Gherib et al., 2016**).

Les bactéries lactiques sont une alternative efficace et économique dans l'élimination des métaux lourds par les processus de bioaccumulation, de biosorption et de détoxification des métaux lourds (**Halttunen et al., 2007 ; kirillova et al., 2017**).

L'objectif principal de ce travail consiste à isoler des souches lactiques à partir de différents produits laitiers (lait, L'ben et Raib) et à étudier quelques caractéristiques morphologiques, culturelles et biochimiques, ainsi que de mettre en évidence leur capacité à tolérer et à éliminer le

cuivre et de sélectionner les souches les plus résistantes et enfin à déterminer la concentration minimale inhibitrice pour ces souches. Les souches les plus puissantes trouveront une application dans la bioremédiation des environnements contaminés par ce métal.

Synthèse bibliographique

Le cuivre est un oligoélément de symbole Cu et de nombre atomique 29, il est potentiellement toxique distribuée dans tous les compartiments de notre environnement (sol, air, eau). (**Pandit et al., 2013**)

I. Les sources de cuivre

Les sources de cuivre se divisent en deux compartiments dans l'environnement : sources naturelles et anthropiques, ces dernières ont été classées en quatre groupes (**tableau 1**) :

- Dépôts atmosphériques.
- Industrie.
- Agriculture.
- Elimination des déchets.

Tableau 1 : Sources naturelles et anthropiques de cuivre

Origine	Source de cuivre	Référence
Naturelle	Erosion éolienne. Dépôt atmosphérique sur le sol. Activité volcanique. Sédiments océaniques (plusieurs centaines de mg/kg ⁻¹ de poids sec). Lacs et rivières.	(Ochoa et al., 2011 ; Ancion et al., 2013 ; Xu et al., 2014 ; Wang et Zang, 2014)
Anthropique	Pesticides, herbicides, fumiers et engrais inorganiques, engrais liés aux activités maraichères. Carburants et galvanoplastie. Ordures ménagères, élimination des déchets. Transport, poussière des véhicules et des panneaux galvanisés. Tanneries et les ateliers de traitement de l'or et de l'argent. Exploitation minière et fonderies. Industries métallurgiques et électroniques, alliages et soudures. Formation militaire et armes, etc. Pigments, peintures et produits chimiques.	(Hashida et al., 2002 ; Liu et al., 2004 ; Wei et al., 2009 ; Tang et al., 2010 ; Mustapha et Halimoon, 2015 ; Manou et al., 2020 ; Zeybek et Dursun, 2021)

II. Pollution environnementale par le cuivre

II.1. Pollution du sol

Les plus fortes concentrations dans les sols représentent une contamination à long terme. Les écosystèmes forestiers agissent comme des barrières biogéochimiques qui atténuent l'intensité de la migration du Cu dans les sols horizontalement et verticalement. Le degré de contamination du sol par les métaux dépend de : la forme chimique, la toxicité, la mobilité et la variation de la biodisponibilité de ces contaminants. (Grigalaviciene *et al.*, 2005).

II.2. Pollution de l'air

La concentration de cuivre a une influence majeure sur la pollution de l'air. Les principales sources de cuivre dans l'air sont les activités industrielles telles que le trafic, le chauffage domestique et le transport à longues distances (Serbula *et al.*, 2014). Les polluants émis dans l'atmosphère par des sources mobiles représentent environ 70% des polluants, principalement le cuivre (environ 440000 tonnes par an) (Grigalaviciene *et al.*, 2005).

II.3. Pollution de l'eau

Les polluants métalliques en fonction de leurs spéciations chimiques une fois dans la colonne d'eau peuvent intégrer facilement les sédiments et s'accumuler au fond de l'eau. Ils forment la matrice environnementale la plus importante qui par le phénomène de relargage constituent une source endogène de pollution des eaux et des espèces aquatiques (Dimon *et al.*, 2014 ; Manou *et al.*, 2020).

En Algérie, Menani *et Zuita* (2004), ont rapporté que le risque de contamination de la nappe phréatique de la plaine d'El Madher (Batna) est dû aux rejets industriels non épurés en amont, les résultats ont montré que les concentrations de cuivre variaient entre 0,75 et 2,26 mg/l pendant la période d'Avril et Mai 2001.

D'autre part, la décharge publique d'Annaba (Berka Zerga) est l'une des nombreuses décharges non contrôlées de l'Algérie. Le site reçoit près de 500 tonnes/jour de déchets solides d'origines urbaine et industrielle stockés directement sur le sol. Les valeurs relevées en cuivre témoignent d'une contamination importante des eaux de la nappe, les teneurs en cuivre sont plus élevées à proximité de l'Oued Zied et de la décharge alors que les faibles valeurs, qui restent largement supérieures à la norme, ont été enregistrées au niveau des points situés au centre de la plaine, loin de toute source de pollution (Tableau 2) (Djorfi *et al.*, 2010).

Tableau 2 : Valeurs de cuivre dans différents sites d'Annaba en Algérie (Djorfi et al., 2010).

Source	La valeur minimale (mg/l)	La valeur maximale (mg/l)
La source de pollution	4,05	/
Au niveau du point P5	/	26,74
Les lixiviats	517,74	256,76

III. Toxicité du cuivre sur la chaîne alimentaire

Les métaux lourds deviennent toxiques lorsqu'ils ne sont pas métabolisés par l'organisme et s'accumulent dans les organes et les tissus. L'utilisation de cultures contaminées par les métaux est une voie majeure de contamination de la chaîne alimentaire qui expose l'Homme à un risque important. Ainsi, le cuivre a des effets indésirables sur la faune et la flore (Jordao et al., 2006 ; Sobha et al., 2007 ; Khan et al., 2008 ; Manou et al., 2020).

Etude de cas : La pollution chez les crabes : Les concentrations en cuivre chez les espèces *Cardisoma armatum* sont supérieures à celles obtenues chez les *Callinectes amnicola*, cette différence de concentration peut être due au mode de vie des deux types d'espèce, il pourrait s'agir également de plusieurs facteurs comme la fréquence d'exposition au métal, sa disponibilité, la capacité de migration de l'espèce, le régime alimentaire et également le fait que les espèces *Cardisoma armatum* ont plus d'affinité pour les sédiments (Manou et al., 2020 ; Zeybek et Dursun, 2021).

III.1. Toxicité du cuivre sur l'Homme

Les métaux lourds pénètrent dans le corps humain via l'inhalation, l'ingestion et l'exposition cutanée (la fabrication d'alliages métalliques et de pigments pour les peintures, le ciment, le papier, le caoutchouc...etc.). Le cuivre à des concentrations élevées dans le corps humain, stimule le système immunitaire et peut provoquer plusieurs atteintes comme les nausées, l'anorexie, les vomissements, les dermatites, une irritation gastro-intestinale sévère lors l'ingestion de 15 à 75 mg de Cu. Sur l'œil, il produit une inflammation, des irritations graves des muqueuses conjonctivales et des lésions capillaires généralisées. De plus, une exposition à longue durée au cuivre peut provoquer une insuffisance rénale, hépatique et des maladies pulmonaires conduisant souvent à un cancer du poumon. Une consommation excessive de Cu modifie la composition du sang ce qui peut entraîner une hémolyse et conduire à une anémie. La toxicité du cuivre peut perturber ou endommager également le système nerveux central et causer la maladie de Wilson, la dystrophie musculaire et la sclérose en plaques, ainsi que des maladies neuro-dégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Argun et al., 2007 ; Gybina et Prohaska, 2008 ;

Turabelidze et al., 2008 ; Mrvcic et al., 2009 ; Ashish et al., 2013 ; Chui et al., 2013 ; Oves et al., 2016 ; Mikoda et al., 2018 ; Fan et al., 2020 ; Hayati et al., 2020 ; Manou et al., 2020 ; Zeybek et Dursun, 2021).

III.2. Toxicité sur les microorganismes

Les métaux lourds exercent généralement une action inhibitrice sur les microorganismes. Ils affectent la structure qualitative et quantitative des communautés microbiennes, entraînant une diminution de l'activité métabolique en bloquant les groupes fonctionnels, déplaçant les ions métalliques essentiels, ou en modifiant le site actif des molécules biologiques, mais à faible concentration, certains métaux sont essentiels pour les microorganismes. Le cuivre est un micronutriment essentiel pour les bactéries, il contribue à diverses réactions redox dans l'organisme, il joue le rôle de cofacteur essentiel pour les métalloprotéines et les enzymes. La toxicité du cuivre est globalement basée sur ses interactions avec les protéines, enzymes, acides nucléiques et métabolites, de la paroi cellulaire, de la membrane et dans le cytoplasme, donc il peut provoquer la destruction de la membrane et l'inactivation des molécules protéiques.

Inversement, l'exposition à long terme au métal lourd peut augmenter la tolérance de la communauté bactérienne à ce dernier, comme dans le cas des champignons tels que les champignons mycorhiziens, qui peuvent jouer un rôle important dans la restauration des écosystèmes contaminés (Ahmed et al., 2005 ; De Mora et al., 2005 ; Oorts et al., 2006 ; He et al., 2010 ; Xu et al., 2014).

III.3. Impact du cuivre sur le milieu aquatique

Les métaux lourds sont très persistants et toxiques même à l'état de traces, et peuvent potentiellement induire des stress oxydatifs graves chez les organismes aquatiques, de plus, ils inhibent la photosynthèse et la croissance du phytoplancton. Ils peuvent être absorbés sous forme inorganique ou organique. Pour le cuivre, la forme inorganique est la plus toxique à faibles concentrations, il peut se dissocier facilement dans les eaux qui sont souvent trouvées dans les rivières (exemple : les diatomées) ou s'installer et s'intégrer dans les sédiments, et peut donc être absorbé par les plantes aquatiques d'autres organismes aquatiques ou se bioaccumuler dans différents organismes aquatiques. Ce contaminant, comme beaucoup d'autres stimule la production des ROS qui peuvent endommager les poissons et autres organismes aquatiques. La consommation de poisson contenant des niveaux élevés de cuivre est une préoccupation parce que l'exposition chronique peut causer des problèmes de santé (Soliman, 2006 ; Morin et al., 2007 ; De Jonge et al., 2008 ; Peng et al., 2008 ; Woo et al., 2009 ; Huët et Puchooa, 2017 ; Zeybek et Dursun, 2021).

III.4. Impact du cuivre sur les plantes

Le cuivre est un métal essentiel pour la croissance et le développement des plantes, bien qu'il soit également toxique. Au niveau cellulaire, le cuivre joue un rôle essentiel dans la signalisation des mécanismes de transcription et de la phosphorylation oxydative. Cependant, à des concentrations élevées, la toxicité peut induire une inhibition des activités enzymatiques ou des fonctions des protéines, une déficience des autres ions essentiels et une altération du processus de transport cellulaire.

Le cuivre dans le sol affecte la qualité de la plante et le rendement, il peut aussi provoquer des changements de taille, de composition et de l'activité de la communauté microbienne ce qui peut conduire à la mort des plantes. Chez des espèces de plantes sensibles comme le riz, le pourcentage de germination est affecté négativement, d'ailleurs, seulement 20 % de germination est obtenu pour une contamination avec 2 mM de Cu. L'utilisation d'un compost contaminé par le cuivre pour améliorer le rendement agricole représente un risque de transfert du cuivre qui menace la santé humaine (Hinojosa *et al.*, 2004 ; Sobha *et al.*, 2007 ; Janas *et al.*, 2010 ; Yao *et al.*, 2012 ; Fan *et al.*, 2020).

IV. Normes et réglementations Algériennes et mondiales

Du point de vue qualité et en raison des effets néfastes du cuivre sur les êtres vivants et l'environnement, les communautés internationales ont établis des normes et des réglementations à respecter concernant les utilisations du cuivre dans les différents domaines environnementaux, afin de protéger l'être humain et son environnement.

Pour cette raison, nous avons indiqué dans le **tableau 3** les normes et réglementations algériennes et mondiales des concentrations de cuivre dans l'eau et la chaîne alimentaire.

Tableau 3 : Normes et réglementations Algériennes et mondiales du cuivre dans l'eau et la chaîne alimentaire.

Paramètres	Normes de Cuivre	Références
Cuivre dans l'eau potable	1 mg/l	(Azzaoui <i>et al.</i> , 2002)
	(OMS, 2004) : 2 mg/l	(Youcef et Achour, 2006 ; Ashish <i>et al.</i> , 2013)
	[Cu] < 3mg /l	(Kumar <i>et al.</i> , 2018)

Tableau 3 : Normes et réglementations Algériennes et mondiales du cuivre dans l'eau et la chaîne alimentaire. (Suite)

Paramètres	Normes de Cuivre	Références
	(CEE) : 0,1mg/l	(Youcef et Achour, 2006)
	Normes américaines et françaises : 1mg/l	(Youcef et Achour, 2006)
Production des eaux destinées à l'irrigation	[Cu] < 0.2 mg/l	(Azzaoui et al., 2002)
Les rejets de l'eau	(CIAPOL) : 0.5mg/l	(Adjiri et al., 2008)
Eaux souterraines	Normes Algériennes : 0.05mg/l	(JORA, 2011)
Eaux superficielles	Normes Algériennes : 2mg/l	(JORA, 2011)
Limite maximale admissible Cu dans le poisson	Normes internationales : 30 $\mu\text{g. g}^{-1}$ poids humide	(Real et al., 2017 ; Ghosh et al., 2020)
Concentrations Cu^{+2} dans les organismes aquatiques	1,3 mg/l	Hasr Moradi Kargar et Hadizadeh Shirazi, 2020)
Environnement aquatique	0.02 $\mu\text{g/l}$ -133 $\mu\text{g/l}$	(Fan et al., 2020)
La (DJA) chez l'être humain	(OMS) : 0,14 mg/kg/j	(Manou et al., 2020)
Produits halieutiques	(OMS, 2006) : 1 mg/kg	(Manou et al., 2020)

V. Elimination du cuivre

Les méthodes classiques utilisées pour éliminer les ions du cuivre sont basées sur des procédés chimiques et des procédés biologiques (Seghairi et al., 2013).

V.1.Procédés physico-chimiques

Le contrôle des teneurs en métaux lourds et en particulier le cuivre dans les eaux de consommation, nécessite le recours à des techniques particulières, efficaces et performantes. Les méthodes de séparation du cuivre des solutions aqueuses sont basées essentiellement sur la cémentation, la précipitation chimique ainsi que des procédés à membrane ou l'adsorption.

V.1.1. Cémentation

Il s'agit de la récupération d'un métal ionisé de la solution par réduction électrochimique spontanée à l'état métallique élémentaire avec l'oxydation consécutive d'un métal sacrificiel. La possibilité d'intensifier le processus de cémentation dans des récipients agités a été étudiée

largement en utilisant les chicanes perforées comme promoteurs de turbulences. Cette méthode est appliquée pour le traitement des eaux usées (**Ibrahim et al., 2021**).

V.1.2. Précipitation

Le cuivre se comporte comme un cation échangeable, se complexe à des groupements fonctionnels à la surface de l'argile et subit une précipitation sous forme d'hydroxydes par élévation du pH. Le temps d'agitation, la dose d'adsorbant, la teneur initiale en cuivre et le pH sont les paramètres qui influencent sur la précipitation (**Youcef et Achour, 2006**).

V.1.3. Adsorption

C'est une technique de faible coût d'entretien, son efficacité est élevée et son fonctionnement est facile. La phénomène d'adsorption implique l'accumulation d'interface d'une substance à une interface (**Youcef et Achour, 2006**). Les résultats de quelques études sur ce processus sont résumés ci-dessous :

- L'élimination du cuivre par des charbons actifs a montré que la cinétique d'adsorption du cuivre est assez lente. Ceci est dû à la compétition entre les ions Cu^+ et les ions H^+ sur la surface du charbon actif (**Tumin et al., 2008 ; Bohli et al., 2013 ; Ghaedi et al., 2015**).
- L'efficacité et la rapidité du processus d'adsorption du cuivre étaient mises en évidence sur deux argiles bentonitiques en utilisant une dose de 2g/l d'argile. Les résultats ont montré que la bentonite sodique est légèrement plus efficace que celle calcique (**Youcef et Achour, 2005**).
- L'équilibre d'adsorption du cuivre sur l'argile brute est atteint après 20 min de contact. Ce qui montre l'efficacité d'adsorption du Cu^{+2} qui est améliorée avec le pH (formation des oxydes de cuivre), la masse de l'argile et la concentration de l'adsorbat (**Abollino et al., 2003 ; Youcef et Achour, 2005 ; Bohli et al., 2013 ; Bendaho et al., 2014 ; Ghaedi et al., 2015**).
- La mise en évidence du caractère exothermique du phénomène d'adsorption dans les eaux de rejet industriel de la région de Annaba, sur une argile locale (kaolin) a montré que la quantité de cation Cu^{+2} adsorbé sur un gramme de solide adsorbant est optimale à 25°C et décroît lorsque la température du milieu augmente (**Djeffal, 2008**).

Les inconvénients

- ✓ Ces procédés sont très coûteux surtout si les concentrations des métaux sont de l'ordre de 1 à 100 ppm en métaux dissous (par exemple, l'excavation de matériel contaminé et le traitement chimique/physique) (**Cheraghi et al., 2011**).
- ✓ Elles provoquent des changements irréversibles dans les propriétés du sol et des perturbations de la microflore du sol natal (**Seghairi et al., 2013**).

V.2. Bioremédiation

V.2.1. Relation microorganisme / plante à l'égard du cuivre

Les interactions entre les plantes et les micro-organismes bénéfiques de la rhizosphère peuvent améliorer la production et la tolérance de la biomasse végétale aux métaux lourds dans un environnement de stress, ce qui rend les micro-organismes une composante importante de la technologie de phytoremédiation. Ceci est dû à la production des sidérophores, la synthèse des phytohormones et des enzymes ou à la solubilisation du phosphate inorganique, l'absorption et l'accumulation des métaux lourds. Les bactéries rhizosphériques ont différents degrés de résistance au Cu et pourraient être co-résistantes, certaines pourraient être résistantes à un niveau élevé de Cu tels que *Bacillus* et *Micrococcus* (Dell'Amico et al., 2005 ; Madhaiyan et al., 2007 ; Nair et al., 2007 ; Jiang et al., 2008 ; He et al., 2010).

L'élimination du cuivre se fait pendant la phase logarithmique précoce de la croissance bactérienne et se poursuit jusqu'à la phase logarithmique tardive, elle s'arrête au début de la phase stationnaire (Ahmed et al., 2005).

Dans ce même contexte, cinq souches de bactéries isolées de la racine de la plante aquatique *Eichhornia crassipes*, ont montré une résistance à plus de 400 mg. l⁻¹ de Cu (Ghosh et al., 2010).

Les EPS sont à la fois très mobiles et très réactives avec les métaux, donc ils peuvent être utilisés pour décontaminer les eaux souterraines et les sols pollués. Pour cela on les utilise dans le processus de bioremédiation par leur participation dans la floculation et l'adhésion des ions métalliques en solution (Guibaud, 2003 ; Ha, 2010).

Pistia stratiotes est un hyper-accumulateur de Cu dans l'eau. Les bactéries rhizosphériques peuvent également produire des EPS qui interagissent avec les métaux pour limiter leur accumulation dans les racines des plantes. Un taux élevé d'accumulation de Cu dans la masse cellulaire semble être le principal mécanisme des bactéries résistantes au Cu isolées de la racine de *P. stratiotes* pour éliminer le Cu dans l'eau (Ghosh et al., 2010).

V.2.2. Phytoremédiation

C'est une technique relativement simple, efficace et respectueuse de l'environnement pour éliminer les charges des métaux lourds. La phytoremédiation est une technologie émergente qui utilise diverses plantes pour l'assainissement de l'environnement (sol, eau et air) par dégradation, accumulation et stabilisation des contaminants, il parvient à détoxifier ces polluants jusqu'au stade du CO₂, de l'eau et des sels minéraux inoffensifs. (Gherib et al., 2016 ; Cameselle et al., 2019). Parmi les plantes utilisées dans le processus d'élimination de cuivre par la phytoremédiation on a : *Potamogeton pectinatus* et *P. malaiianus* (Peng et al., 2008), *Chenopodium botrys* (Cheraghi et al., 2011), *Iris ensata*, *Scirpus radicans* et *Typha orientalis* (Usman et al., 2012), tamarix et *Papyrus*

(Seghairi et al., 2013). L'absorption des métaux par les plantes peut être influencée par de nombreux facteurs, notamment le pH du sol, la capacité d'échange cationique, la teneur en argile, la teneur en matière organique et la présence d'autres ions (Huang et al., 2004 ; Olson et al., 2008 ; Jung et al., 2011).

VI. Tolérance des bactéries lactiques au cuivre

VI.1. Bactéries lactiques et cuivre

Les probiotiques sont des bactéries bénéfiques présentes dans le microbiote intestinal. Elles interviennent principalement dans le processus de digestion et renforcent le système immunitaire. Les souches de bactéries lactiques capables de réduire l'absorption des substances toxiques par le système gastro-intestinal appartiennent, pour la plupart à l'ordre des *Lactobacillales*, notamment les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* et *Bifidobacterium*. De plus, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium lactis* sont capables de se lier et éliminer les métaux lourds en raison de structures spécifiques trouvées sur leur paroi cellulaire qui est composée de peptidoglycane, d'acide teichoïque et lipotéichoïque, une couche S, et des polysaccharides neutres. L'acide teichoïque, les polysaccharides de la paroi cellulaire, les EPS, les groupes carboxyles, les groupes phosphate et les groupes phénols permettent l'adsorption aux métaux lourds (Costa et Duta, 2001 ; Mrvcic et al., 2009 ; Bestway et al., 2013 ; Surayot et al., 2014 ; Zhai et al., 2015 ; Huët et Puchooa, 2017). Dans l'étude de Hayati et al., (2020), les chercheurs ont montré que l'intestin des poissons est colonisé par des probiotiques comportant des bactéries lactiques. Ces bactéries lactiques peuvent aider à améliorer les activités des enzymes digestives telles que les amylases, les lipases et les protéases. Les chercheurs ont prouvé que l'ajout des bactéries probiotiques suivantes : *Lactobacillus buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. bulgaricus* et *Lb. fermentum* dans l'alimentation des poissons pouvait réduire l'impact des métaux lourds toxiques. Lorsque les poissons ont été exposés au Cu, les compléments alimentaires aux probiotiques ont pu réduire efficacement l'œdème et la nécrose hépatocytaire du chez le poisson par l'amélioration et la performance de la croissance et la prévention de la toxicité.

VI.2. Mécanismes de tolérance des bactéries lactiques au cuivre

Le cuivre est un métal de transition avec trois états d'oxydation : Cu^0 , Cu^+ et Cu^{+2} . Parmi ceux-ci, Cu^{+2} est la forme inorganique du cuivre la plus facilement disponible et la plus toxique. Sa toxicité est basée sur la production des radicaux hydroperoxydes et son interaction avec la membrane. Il a été démontré que les espèces bactériennes résistent au cuivre par divers mécanismes notamment l'adsorption (biosorption), l'échange d'ions, la complexation, la chélation, la

microprécipitation et la bioaccumulation...etc (Ahmed et al., 2005 ; Mrvcic et al., 2009 ; Fan et al., 2020). Parmi ces mécanismes on peut citer les suivants :

VI.2.1. La biosorption

La biosorption est un processus passif non métabolique, les EPS jouent un rôle important dans l'adhésion, ils forment des agrégats cellulaires et protègent les cellules des agressions du milieu, ils sont potentiellement fixateurs de métaux. Enfin les bactéries peuvent influencer la mobilité des métaux par des modifications physicochimiques (la modification du potentiel redox ou du pH) (Ahmed et al., 2005 ; Bhaskar et Bhosle, 2006 ; Guiné, 2006).

VI.2.2. L'accumulation

L'accumulation est un processus actif associé au métabolisme dont lequel le métal est sous forme oxydée qui est accumulé à l'intérieur des cellules sous forme de cations à l'état de traces. Il peut aussi traverser la membrane cellulaire par des phénomènes de diffusion, soit à travers les canaux ioniques, à l'aide des protéines de transport afin de réduire les concentrations cytoplasmiques par rapport aux niveaux potentiellement toxiques (Ahmed et al., 2005 ; Zeybek et Dursun, 2021).

VI.2.3. La séquestration

La séquestration intracellulaire se fait via des molécules inductibles de type métallothionéine de faible poids moléculaire riches en groupes sulfhydryle (Ahmed et al., 2005).

VI.2.4. L'efflux actif

Les pompes à efflux est un mécanisme qui repose sur une pompe insérée dans la membrane nécessitant de l'énergie qui permet l'absorption et l'efflux du métal lourd et donc la diminution de sa concentration intracellulaire (Ahmed et al., 2005 ; Bruce et al., 2009).

VI.2.5. La détoxification enzymatique

Elle consiste à convertir le métal en une forme moins toxique ou en une autre forme qui peut être plus facilement évacuée par la cellule, cette transformation peut se faire par voie enzymatique, par oxydation ou réduction, ou encore après réaction avec un produit du métabolisme énergétique de la cellule (Sarret et al., 2005).

Les résultats de Abicht et al., (2013) soutiennent un modèle dans lequel les électrons circulent du NADH vers la ménaquinone via une NADH oxydase liée à la membrane. Si la cytochrome bd oxydase est présente, ses équivalents réducteurs sont utilisés pour réduire l'oxygène en eau. En absence d'oxydase, il y aura un excès d'équivalents réducteurs, typique des organismes en fermentation. Ainsi, toute opportunité de transmettre des électrons à un substrat sera favorable aux cellules. Il a été montré que les ménaquinones contribuent substantiellement à la réduction du

potentiel redox du lait par *L. lactis*. Le cuivre semble également être un accepteur approprié pour les équivalents réducteurs en excès, résultant en une activité extracellulaire de cuivre réductase observée.

D'autre part, la réduction de la ménaquinone est accomplie par les deux NADH-oxydases liées à la membrane, *noxA* ou *noxB*, qui font partie de la chaîne de transport d'électrons comme indiqué sur la **Figure 1**.

La réduction du cuivre par la ménaquinone est très probablement un mécanisme fortuit. Il produit les ions Cu^+ les plus toxiques qui interfèrent avec la croissance. Deuxièmement, le cuivre n'est pas normalement présent en concentrations suffisantes dans les habitats naturels de *L. lactis* pour être utilisé pour la respiration métallique. Dans le lait, où *L. lactis* pousse le plus souvent, il réduit considérablement le redox potentiel du lait, vraisemblablement comme moyen d'éliminer les équivalents réducteurs en excès.

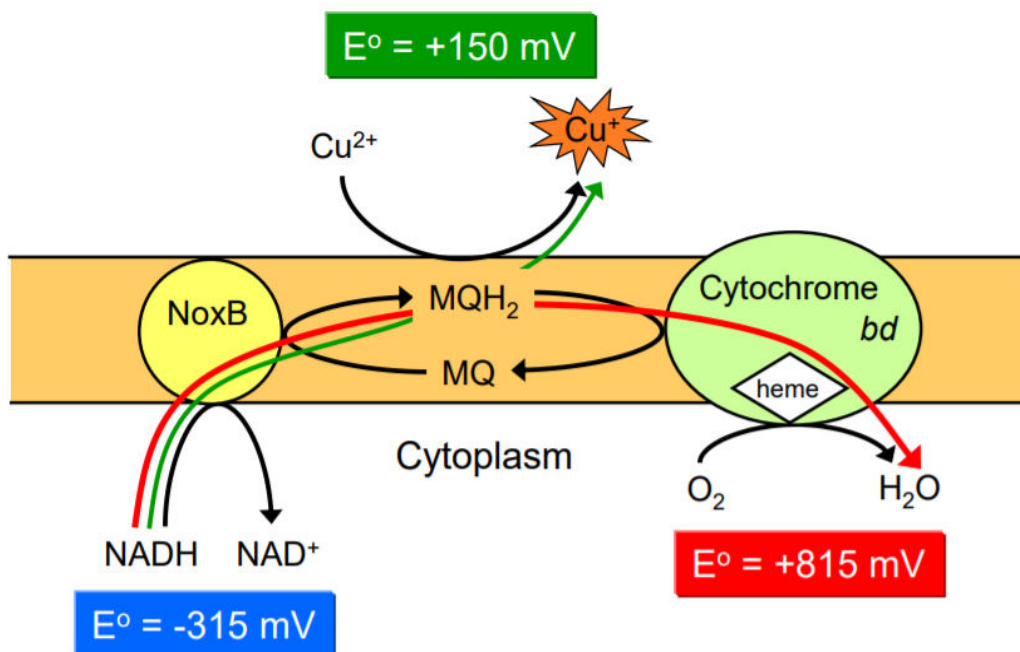


Figure 1 : Réduction du cuivre chez *Lactococcus lactis* (Abicht et al., 2013).

Un élément clé de l'homéostasie du cuivre chez toutes les bactéries est le transport du cuivre par les ATPase. Elles pompent l'excès de cuivre hors du cytoplasme. Les espèces ioniques transportées par les Cu-ATPases bactériennes semblent être Cu^+ dans la plupart des cas (Abicht et al., 2013), mais des ATPases transportant les ions Cu^{+2} ont également été décrites chez certaines espèces comme *Bacillus subtilis*.

Les études de **Chillappagari et al., (2009)** ont été conduites pour comprendre les mécanismes sous-jacents à l'homéostasie du cuivre chez *Bacillus subtilis* dans des conditions limitant le cuivre. Ces études ont révélé que le gène *ycnJ* code pour une protéine qui joue un rôle important dans le métabolisme du cuivre, car il montre une régulation huit fois plus élevée dans des conditions limitant de cuivre et sa perturbation provoque un phénotype de croissance défectueux sous privation de cuivre ainsi qu'une teneur intracellulaire réduite en cuivre. De plus, la protéine membranaire YcnJ a révélé sa forte affinité pour les ions Cu^{+2} *in vitro*.

D'autres études ont démontré que le régulateur d'efflux de cuivre récemment identifié CsoR est également impliqué dans la régulation de l'expression de *ycnJ*, conduisant à un nouveau modèle pour l'homéostasie du cuivre chez *B. subtilis* **Figure 2**.

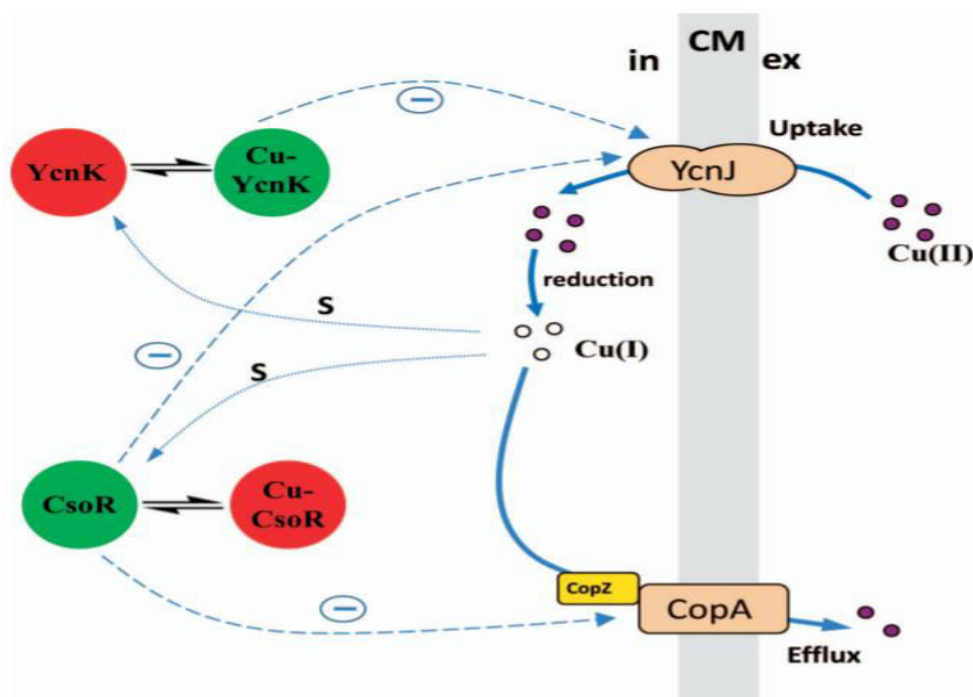


Figure 2 : Modèle actuel de l'homéostasie du cuivre chez *B. subtilis*, y compris les composants fonctionnels pour l'absorption et l'efflux du cuivre ainsi que leur répresseur apparenté.

(Chillappagari et al., 2009)

En fonction de l'association de *B. subtilis* avec le cuivre, l'état actif des répresseurs transcriptionnels, YcnK et CsoR est représenté en vert, et l'état inactif des répresseurs transcriptionnels est indiqué en rouge. La régulation négative des composants est indiquée par des flèches en pointillés. La ou les détections de cuivre sont indiquées par des flèches en pointillés.

VII. Application des bactéries lactique tolérantes au cuivre en bioremédiation

La bioremédiation des eaux polluées à l'aide des bactéries lactiques pourrait être une alternative aux méthodes de traitements conventionnelles. Dans cette partie nous aborderons quelques

exemples d'application du potentiel dépolluant des BL dans les processus de bioremédiation des différents compartiments environnementaux.

Généralement, l'élimination du cuivre se fait par inoculation directe des cellules vivantes libres de lactobacilles, considérées comme inoffensives (GRAS) ou par biomasse immobilisée. Les cellules immobilisées se sont avérées plus efficaces et réutilisables par rapport aux cellules libres. Cependant, le processus d'immobilisation des cellules dans les billes d'alginate de calcium doit être standardisé pour obtenir une bioaccumulation optimale. Le risque de saturation ou de colmatage des billes diminue la capacité d'accumulation totale dans les solutions à plusieurs éléments (**Schut et al., 2011 ; Durve et al., 2013**).

Les capacités d'adsorption des lactobacilles ont été également considérées dans le secteur alimentaire pour la détoxification du cuivre. **Schut et al., (2011)**, ont déterminé la capacité d'adsorption maximale pour *Lb. buchneri*, *Lb. vini*, *Lb. plantarum* et *Lb. hilgardii*, les valeurs étaient les suivantes : 46,2, 21,9, 17,4 et 11,9 (μg de Cu^{+2} . mg^{-1} cellules), respectivement.

Certaines souches probiotiques, telles que *Lactobacillus* spp, constituent des solutions prometteuses pour l'élimination des métaux lourds dans les aliments, l'eau et le sol. L'élimination du cuivre par les biomasses de *Lb. fermentum* et *Lb. plantarum* d'une solution aqueuse a montré que le taux de biosorption du cuivre dépendait de la concentration initiale du métal et du temps de contact. Le taux maximal de biosorption du cuivre par les souches de *Lactobacillus* s'est produit dans les cinq premières minutes. Cependant, les bactéries qui n'étaient pas saturées ont poursuivi leur processus d'élimination. *Lb. fermentum* avait une tendance plus élevée à la biosorption des métaux par rapport à *Lb. plantarum*. La biomasse de *Lb. fermentum* est un biosorbant largement disponible et très efficace, qui pourrait être appliquée pour la bioremédiation environnementale du cuivre en milieu aquatique (**Hasr Moradi Kargar et Hadizadeh Shirazi, 2020**).

Dans une autre étude, un *Bacillus licheniformis* CC01 provenant du bois traité pouvait éliminer efficacement 93% du cuivre fixé sur le bois. *B. licheniformis* CC01 laisse la fibre de bois intacte pour le recyclage en produits composites. Le module de l'élasticité reste inchangé et le balayage sous microscope électronique ne révèle aucun dommage à la paroi cellulaire du bois (**Clausen, 2000**).

Matériels et Méthodes

La partie pratique de notre travail a été réalisée au niveau du « Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mohammed Seddik Ben yahia-Jijel », durant la période Avril- Juin 2021.

Ce travail comporte :

- ✓ L'isolement de quelques bactéries lactiques tolérantes au cuivre à partir du lait et dérivés.
- ✓ L'identification partielle des souches sélectionnées.
- ✓ L'évaluation de l'effet du cuivre sur la croissance bactérienne et la détermination de la CMI.
- ✓ La recherche de la production des EPS.
- ✓ L'étude du processus d'élimination du cuivre.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

Echantillons : Lait de vache cru, L'ben et Raib de la laiterie Rana.

I.2. Milieux de culture

- Gélose MRS (Institut Pasteur)
- Bouillon MRS (Institut Pasteur)
- Gélose hypersaccharosée
- MRS modifié

I.3. Produits chimiques et réactifs

- CuSO_4
- Agar-agar
- Citrate d'ammonium
- Acétate de sodium
- Peptone
- Extrait de levure
- Extrait de viande
- Glucose
- Lactose
- Saccharose
- $\text{K}_2 \text{HPO}_4$
- SO_4Mg
- SO_4Mn
- Tween 80%
- NaOH
- HCl

- NaCl
- Phénol
- TCA
- Acide sulfurique
- H₂O₂
- Eau physiologique
- Eau distillée
- Cristal violet
- Lugol
- L'éthanol à 95°
- Fuschine
- Lugol
- Huile à immersion

I.4. Appareillage

- Bec Bunsen
- Bain marie (Mettler)
- Micropipette (BIOCONTROL)
- Balance électronique (Kern EMB 600-2)
- Agitateur magnétique chauffant (VELP scientifica)
- Autoclave (Silli AVX électrique, pbibrand)
- Etuve 25°C (Mettler)
- Etuve 37°C (Mettler)
- Etuve 45°C (Mettler)
- Four pasteur (Mettler)
- Réfrigérateur (ENIEM)
- Vortex (Heidolph REAX top)
- Centrifugeuse (SIGMA 1-14)
- Centrifugeuse réfrigérée à 4°C (SIGMA 3-16 PK)
- Spectrophotomètre optique (analytik jena)
- pH mètre (Hanna)
- Microscope optique (OLYMPUS OPTICAL CHK2-F-GS)
- SAA (AA-6200 SHIMADZU)

II. Méthodes

II.1. Isolement des bactéries lactiques

Trois échantillons (Lait cru, L'ben, Raib) ont été collectés de façon aléatoire à partir des produits de la « laiterie Rana » à Jijel.

II.1.1. Préparation des solutions mères

Le prélèvement a été réalisé dans des flacons stériles. Un ml de chaque échantillon a été homogénéisé avec 9 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,85%) pour obtenir une solution mère (SM). Des dilutions en série allant de 10^{-1} à 10^{-4} ont été effectuées pour chaque échantillon.

II.1.2. Isolement des bactéries lactiques (BL)

0,1 ml de la dilution appropriée (10^{-1} , 10^{-2} pour le lait, et 10^{-3} et 10^{-4} pour L'ben et Raib) a été étalé sur le milieu MRS sélectif pour les bactéries lactiques (De Man-Rogosa-Sharpe) (**annexe 01**), préalablement coulé et solidifié dans des boîtes de Pétri. L'incubation était effectuée pendant 24 à 48h à 37°C en conditions anaérobies (**Wang et al., 2014 ; Bai et al., 2016**).

II.1.3. Screening et purification des souches lactiques tolérantes au cuivre

Après incubation, nous avons sélectionné aléatoirement des colonies pour le criblage sur gélose MRS additionnée de cuivre 30 mg/l (**annexe 02**) (**Ghosh et al., 2020**) par la méthode des quadrilles. L'incubation était effectuée pendant 24h à 37°C.

La purification des colonies tolérantes au cuivre à 30 mg/l de couleur laiteuse ou blanchâtre ont été retenues et repiquées sur la gélose MRS additionnée de cuivre par la méthode des stries. Plusieurs repiquages successifs ont été réalisés pour chaque souche isolée jusqu'à obtention des colonies pures de même taille, même forme et même couleur (**Lairini et al., 2014**).

II.2. Identification partielle des BL isolées

L'identification partielle des BL isolées a été réalisée grâce à des techniques classiques de microbiologie, basées essentiellement sur la recherche de certains nombres de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Une observation macroscopique visuelle a permis de distinguer les bactéries lactiques cultivées sur gélose MRS, suivie par une observation microscopique après coloration de Gram. L'étude physiologique consiste à soumettre les isolats aux tests suivants : recherche de la catalase, de la capacité à croître à différentes températures (25°C, 37°C, 44°C), en présence de différentes concentrations en NaCl (4%, 6.5%), la détermination du type fermentaire par la mise en évidence de trouble avec la production de gaz (CO₂) et la production de l'EPS (**Ammor et al., 2005 ; Lairini et al., 2014 ; Mostefaoui et al., 2014 ; Dahou et al., 2015 ; Bai et al., 2016 ; Sandes et al., 2017**).

II.2.1. Critères morphologiques

- **Macroscopiques** : Ils sont portés sur l'observation macroscopique à l'œil nu des colonies ce qui permet de décrire l'aspect, la forme, la couleur et la disposition des colonies sur milieu MRS.
- **Microscopiques** : La coloration de Gram (**annexe 03**) permet de différencier entre deux groupes principaux de bactéries ; bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les coques, les bacilles et le mode de regroupement, cette différenciation est basée sur la composition de la paroi des cellules bactériennes (la couche de peptidoglycane). L'observation a été réalisée par un microscope optique (G x100) (**Badis et al., 2004 ; Zantar et al., 2013**).

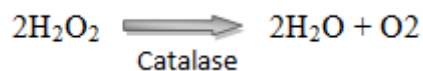
II.2.2. Critères physiologiques et biochimiques

II.2.2.1. Revivification des souches

Avant la réalisation des tests d'identification, les souches ont été revivifiées aseptiquement sur bouillon MRS, après elles ont été incubées à 37°C pendant 18 h.

II.2.2.2. Test de la catalase

Ce test permet de déterminer la présence de l'enzyme responsable de la transformation du H₂O₂ en H₂O et O₂.



Une colonie typique de la culture a été placée sur une lame de verre propre puis une goutte de H₂O₂ a été ajoutée, mélangée et observée. Un dégagement de bulle de gaz signifie que la souche est capable de décomposer le H₂O₂, donc Catalase (+), alors que le contraire indique qu'elle est catalase (-) (**Ahirwar et al., 2017**).

II.2.2.3. Type fermentaire

Ce test permet d'apprécier le métabolisme (homofermentaire ou hétérofermentaire) avec lequel la source de carbone est transformée en CO₂.

Le test est réalisé dans des tubes contenant du bouillon MRS (10 ml) et une cloche de Durham. On ensemence les souches dans ces tubes et on les incube à 37°C pendant 24h à 48h. La présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire. L'accumulation de gaz dans les cloches de Durham est prise comme preuve de la production de CO₂ par les bactéries hétérofermentaires (**Badis et al., 2004**).

II.2.2.4. Croissance à différentes températures

Le test est réalisé par l'ensemencement (200 µl) des souches fraîches développées sur bouillon MRS dans des tubes contenant le bouillon MRS (10 ml) et qui sont incubées à différentes températures (25°C, 30°C et 44°C) pendant 48 h pour la différenciation entre les souches lactiques mésophiles et les souches thermophiles. La croissance est révélée par la turbidité du milieu (**Badis et al., 2004**).

II.2.2.5. Croissance en présence de NaCl

Ce test est réalisé par l'ensemencement des souches fraîches dans le bouillon MRS en présence de deux concentrations de NaCl : 4% et 6.5%, l'incubation est faite pendant 24h à 48h à 37°C pour distinguer les espèces sensibles aux variations de la pression osmotique. La croissance de la souche est révélée par l'apparition d'un trouble (**Ammor et al., 2005 ; Badis et al., 2005**).

II.3. Screening des bactéries lactiques tolérantes au cuivre

Le test de screening a pour but de sélectionner les souches lactiques capables de tolérer le cuivre dans le milieu MRS. Pour cela, 200 µl des souches sélectionnées sont ensemencés dans 10 ml de bouillon MRS avec 30 mg/l de Cu⁺², l'incubation a été effectuée à 37°C. La mesure de la DO à 600 nm a été faite sur des aliquotes récoltés dans les temps T_{0h}, T_{24h}, T_{48h}, T_{72h} et /ou T_{96h}. Parallèlement, une autre série de tubes a été préparée avec du bouillon MRS (10 ml) et ensemencée par 200 µl de la souche désirée, ces tubes ont été considérés comme témoins positifs de la croissance (**Focardi et al., 2013 ; Kinoshita et al., 2013**).

II.3.1. Criblage primaire des souches productrices d'EPS

Ce test a été réalisé afin de confirmer la capacité des bactéries lactiques à produire des EPS sur gélose hypersaccharosée (**annexe 04**) afin d'exploiter ces macromolécules dans les processus d'élimination du cuivre présent dans le milieu.

Les cultures bactériennes jeunes sont ensemencées par stries et incubées à 37 °C pendant 48h. Les souches productrices d'EPS présentent un aspect visqueux avec des colonies larges et gluantes (**Mostefaoui et al., 2014 ; N'tcha et al., 2016**).

II.3.2. Production des EPS

Le screening primaire a été complété par une évaluation quantitative de la production des EPS sur milieu liquide. Pour cela, des erlenmeyers de 200 ml contenant 20 ml de bouillon MRS modifié (20g/L de glucose est remplacé par le lactose) (**annexe 05**) est ensemencés par 1% des cultures bactériennes jeunes qui sont par la suite incubés 37 °C pendant 24h. (**Savadoغو et al., 2004 ; Li et**

al., 2014). La teneur totale en EPS est déterminée par la méthode au phénol-acide sulfurique en utilisant le glucose comme standard pour le traçage de la courbe d'étalonnage.

II.3.3. Extraction des EPS

Après la période d'incubation, les cellules ont été séparées par centrifugation à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C. Ensuite, une solution de TCA (**annexe 06**) a été ajoutée au surnageant pour donner une concentration finale de 4% (masse/volume). Les protéines précipitées ont été éliminées par centrifugation (12 000 x g pendant 30 min à 4°C). Deux volumes d'éthanol ont été ajoutés aux surnageants, agités vigoureusement et maintenus à 4°C pendant une nuit. L'EPS brut a été recueilli par centrifugation à 15 000 x g pendant 15 min à 4°C, puis le culot EPS a été dissous dans l'eau distillée (**Abid et al.**, 2018).

II.3.4. Quantification des EPS

Les EPS ont été quantifiés selon la méthode au phénol-acide sulfurique de **Dubois et al.**, (1956), qui repose sur le traçage d'une courbe standard par la préparation de différentes dilutions d'une solution de glucose 1mg/ml en suivant la même procédure que celle pour l'EPS. Dans des tubes contenant 500µl de l'échantillon (la solution d'EPS), on ajoute 0.5ml de phénol (6%) (**annexe 07**) suivi de 2 ml de l'acide sulfurique avec une agitation immédiate par le vortex. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 490 nm contre un blanc qui contient de l'eau distillée au lieu de l'échantillon. La teneur en EPS a été calculée en utilisant la courbe étalon du glucose (**Felz et al.**, 2019).

Pour la préparation de cette courbe d'étalonnage, une solution mère de glucose a été préparée (100 mg de glucose ont été ajoutés à 100 ml d'eau distillée). Pour obtenir une concentration de 1mg/l des dilutions à 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} ont être préparées : 10 ml de la solution mère ont été ajoutés à 90ml d'eau distillée, puis 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 6ml, 7ml, 8ml et 9ml de cette concentration ont été ajoutés respectivement à 9ml, 8ml, 7ml, 6ml, 5ml, 4ml, 3ml, 2ml et 1ml d'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à 490 nm (**Chun-lei et al.**, 2014).

II.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du cuivre

Le test de la détermination de la concentration minimale inhibitrice a été réalisé comme suit : La CMI a été déterminée avec des concentrations de cuivre allant de 50 mg/l à 400 mg/l (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 et 400 mg/l). Le test consiste à ensemercer aseptiquement 400 µl de l'inoculum préalablement cultivé des souches LGS1, Lb41, R15, dans une série de tubes à essai contenant 10 ml de bouillon MRS et avec des concentrations croissantes de cuivre. Parallèlement, un témoin ne contenant que du bouillon MRS et le métal, a aussi été préparé pour les souches testées. L'incubation est réalisée à 37°C et la croissance bactérienne a été déterminée par mesure de la

densité optique à 600 nm entre T_{0h} et T_{24h} . La CMI est définie comme la plus faible concentration qui inhibe complètement la croissance de la souche bactérienne ($DO_{T_{24h}} - DO_{T_{0h}} > 0$) (Wei et al., 2009 ; Mohapatra et al., 2017).

II.5. Test d'élimination du cuivre

Dans ce test, nous avons évalué la capacité des souches lactiques sélectionnées, LGS1, Lb41 et R15 à éliminer le Cu^{+2} . 50 ml de bouillon MRS sont préparés avec 50 mg/l de Cu^{+2} obtenus à partir de la solution mère. Le milieu est ensuite inoculé par 1ml de la culture fraîche et incubé à 37 °C pendant 72h. 5 ml des échantillons ont été recueillis à temps 0 et à des intervalles de temps différents et centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 min après avoir mesuré la DO de la biomasse en culture à 600 nm, le surnageant a été récupéré et filtré par des filtres millipores (0.22µm) pour mesurer la concentration du cuivre résiduel à T_{0h} , T_{24h} , T_{48h} et T_{72h} par spectroscopie d'absorption atomique. (Huët et Puchooa, 2017)

Analyse du cuivre résiduel par spectroscopie d'absorption atomique

Les échantillons préalablement récupérés à T_{0h} , T_{24h} , T_{48h} et T_{72h} sont dilués jusqu'à 10^{-3} pour ajuster les concentrations du Cu des échantillons dans l'intervalle de la courbe standard [0-6] ppm. La DO est mesurée par le SAA (AA-6200 SHIMADZU). L'efficacité d'élimination des métaux lourds par les BL a été calculée en pourcentage d'élimination en utilisant l'équation ci-dessous (Ahuja, 2009)

$$\% \text{ d'élimination} = \frac{\text{Concentration finale du métal lourd}}{\text{Concentration initiale du métal lourd}} \times 100$$

Résultats et Discussion

I. Identification des isolats

Au cours de ce travail nous avons partiellement identifié les genres des 11 souches lactiques isolées à partir du lait, du L'ben et du Raib par les méthodes classiques basées sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

II. Critères morphologiques

II.1. Macroscopiques

Cet examen a révélé l'apparition de colonies bien visibles, de petite taille, d'environ 0.5 à 1 mm de diamètre, de forme ronde, circulaire, à contour régulier d'une couleur blanchâtre ou laiteuse. **(Photos n°1 et n°2), (Tableau 04).**



Photo n° 1 : Observation macroscopique des colonies lactiques sur gélose MRS.



Photo n° 2 : Observation macroscopique de la bactérie lactique (ANS3) après purification

II.2. Microscopiques

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a montré que toutes les bactéries retiennent la couleur violette ce qui confirme qu'on est face à une collection de bactéries à Gram positif. Les formes des cellules étaient distinctes ; des cocci et des bacilles, dont le mode de regroupement varie d'une souche à l'autre : chainette, diplocoques et en amas. **(Photos n°3 et n°4), (Tableau 04).**



Photo n° 3 : Observation microscopique (Objectif X100) de la souche lactique, **LS2**, isolée du lait, après coloration de Gram.

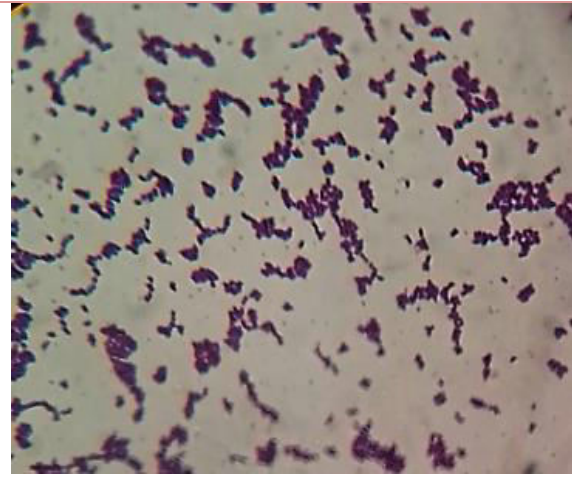


Photo n° 4 : Observation microscopique (Objectif X100) de la souche lactique, **R22**, isolée du Raib après coloration de Gram.

Tableau 04 : Critères macroscopiques et microscopiques des souches lactiques isolées.

Echantillon	Code	Critères Macroscopiques	Critères Microscopiques	
			Aspect	Mode de regroupement
Lait	L21	Colonies laiteuses Circulaires, contour régulier.	Cocci	En chaînette.
	L23	Petites colonies fines blanchâtres circulaires contour régulier.	Cocci	En chaînette.
	L30	Petites colonies fines blanchâtres circulaires.	Cocci	En chaînette.
	LS2	Colonies bombées blanchâtres circulaires contour régulier.	Bacille	En chaînette.
L'ben	ANS3	Colonies bombées blanchâtres circulaires contour régulier.	Bacille	En chaînette.
	LGS1	Colonies laiteuses bombées blanchâtres circulaires contour régulier.	Cocci	Diplocoques et en amas.
	Lb41	Petites colonies laiteuses blanchâtres circulaires contour régulier.	Cocci	En chaînette.
	N5	Colonies laiteuses bombées blanchâtres circulaires contour régulier.	Cocci	En chaînette.

Tableau 04 : Critères macroscopiques et microscopiques des souches lactiques isolées. (Suite)

Raib	R15	Colonies convexes blanchâtres circulaires contour régulier.	Cocci	En chaînette.
	R16	Colonies convexes blanchâtres circulaires contour régulier.	Cocci	En chaînette.
	R22	Colonies convexes blanchâtres circulaires contour régulier.	Cocci	En chaînette

III. Caractères physiologiques et biochimiques

Après les deux tests préliminaires, la coloration de Gram et la catalase ; les souches à Gram positif et catalase négative seront retenues par la confirmation de leur appartenance à la flore lactique (**Tableau 05**).

III.1. Test de la catalase

L'absence de dégagement de gaz a révélé que toutes les souches testées sont dépourvues de l'enzyme qui converti le H_2O_2 en O_2 et en H_2O , ce qui explique qu'elles n'ont pas besoin d' O_2 pour leur développement. Donc la catalase est négative.

III.2. Type fermentaire

La production de gaz dans la cloche de Durham a montré que toutes les souches étudiées sont de type hétérofermentaire sauf la souche LGS1 qui est homofermentaire car elle a présenté un trouble seulement.

III.3. Croissance à différentes températures

Dans cet essai, les résultats ont montré que toutes les souches étaient capables de croître dans les trois températures sauf les souches L30, Lb41, R15 et R22 qui n'avaient aucune croissance à $44^\circ C$, donc ce ne sont pas des thermophiles.

III.4. Croissance en présence de NaCl

Toutes les souches testées sont capables de croître dans le bouillon MRS contenant 4% de NaCl. En revanche, il y a un nombre limité de souches testées qui ne peuvent pas croître sur le milieu avec une concentration de 6.5%, c'est le cas des souches R15 et R16 alors que les autres souches ont la capacité de se développer en présence de cette concentration.

Les souches ANS3 et LGS1 ont une forte croissance dans les concentrations 4% et 6.5% de NaCl, donc ce sont des souches halophiles. (**Tableau 05**)

Tableau 05 : Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques isolées du lait et dérivés.

Souche	M	G	Cat	Température			NaCl (%)		Type fermentaire
				25 °C	30 °C	44 °C	4 %	6,5%	
L 21	C	(+)	(-)	+	++	+	+	+	Hétéro
L 23	C	(+)	(-)	++	++	++	+	+	Hétéro
L 30	C	(+)	(-)	+	++	-	+	++	Hétéro
LS2	B	(+)	(-)	++	++	+	++	++	Hétéro
ANS3	B	(+)	(-)	+++	+++	+	+++	+++	Hétéro
LGS1	C	(+)	(-)	+++	+++	++	+++	+++	Homo
Lb 41	C	(+)	(-)	++	++	-	++	+	Hétéro
N 5	C	(+)	(-)	+++	+++	++	++	++	Hétéro
R 15	C	(+)	(-)	++	+	-	+	-	Hétéro
R 16	C	(+)	(-)	++	++	++	++	-	Hétéro
R 22	C	(+)	(-)	++	++	-	+	+	Hétéro

G : Gram, **Cat** : Catalase

M : Morphologies, **B** : Bacille ; **C** : Cocci

(+) : Positive, (-) : Négative

+++ : Croissance, ++ : Croissance modéré, + : Faible croissance, - : Pas de croissance.

D’après ces résultats nous remarquons que les isolats trouvés se divisent en III groupes (**Tableau 06**) et probablement en III genres : 8 souches appartiennent au genre *Leuconostoc*, deux souches appartiennent à *Lactobacillus* et une souche à *Enterococcus*. (**Figure3**)

Tableau 06 : Différents groupes des bactéries lactiques isolées du lait et dérivés.

Groupes		Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques	Genre
Groupe I	L21	Cocci, Gram positif, catalase négatif hétérofermentaire, croissance à différentes températures (25°C, 30°C et /ou 44°C) et différentes concentrations de NaCl (4% et /ou 6,5%).	<i>Leuconostoc</i> (Alegría et al., 2013 ; De Paula et al., 2015 ; Bennani et al., 2017)
	L23		
	N5		
	L30		
	Lb41		
	R22		
	R15		
	R16		
Groupe II	LS2	Bacille, Gram positif, catalase négatif, hétérofermentaire, croissance à différentes températures et différentes concentrations de NaCl.	<i>Lactobacillus</i> (Badis et al., 2005 ; Ao et al., 2012 ; Bennani et al., 2017)
	ANS3		
Groupe III	LGS1	Cocci, Gram positif, catalase négatif homofermentaire, croissance à différentes températures et différentes concentrations de NaCl.	<i>Enterococcus</i> (Bennani et al., 2017 ; Ao et al., 2012)

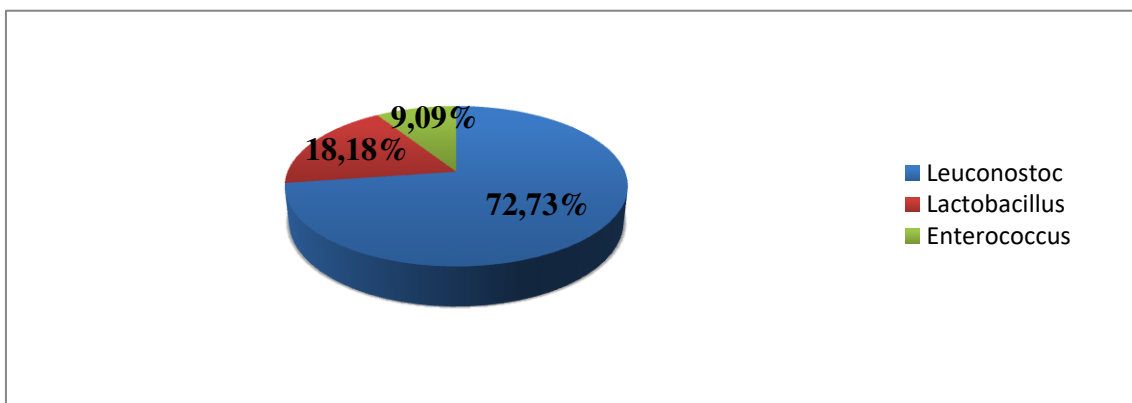


Figure 3 : Distribution de pourcentage des isolats lactiques tolérantes au cuivre.

IV. Screening des souches résistantes au cuivre

Après un délai d'incubation de 72/96 h, les mesures de la densité optique sont représentées dans l'annexe 08 et la tolérance des souches est déterminée en exploitant les courbes représentées dans les figures (4-14), et les valeurs du taux de croissance montrées dans le (Tableau 7) :

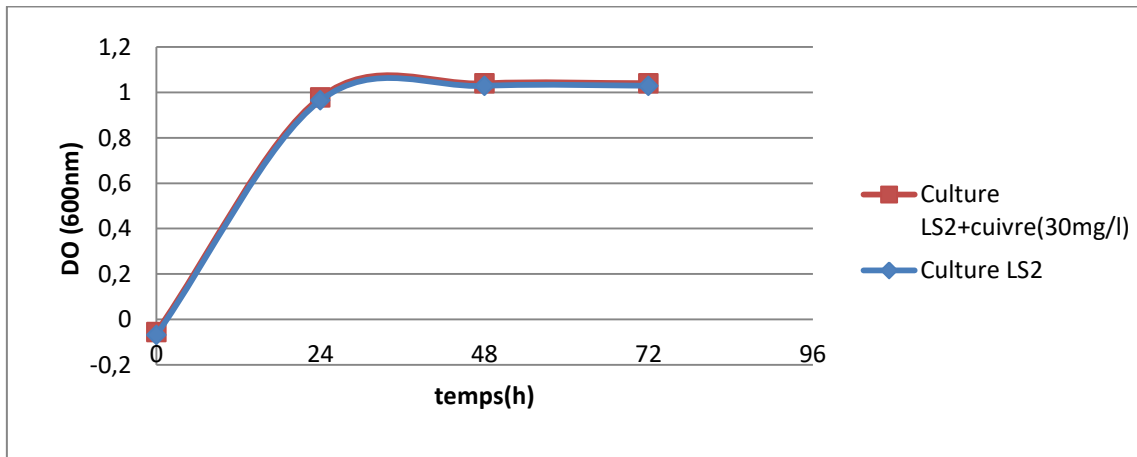


Figure 4 : Cinétique de croissance de la souche **LS2** dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

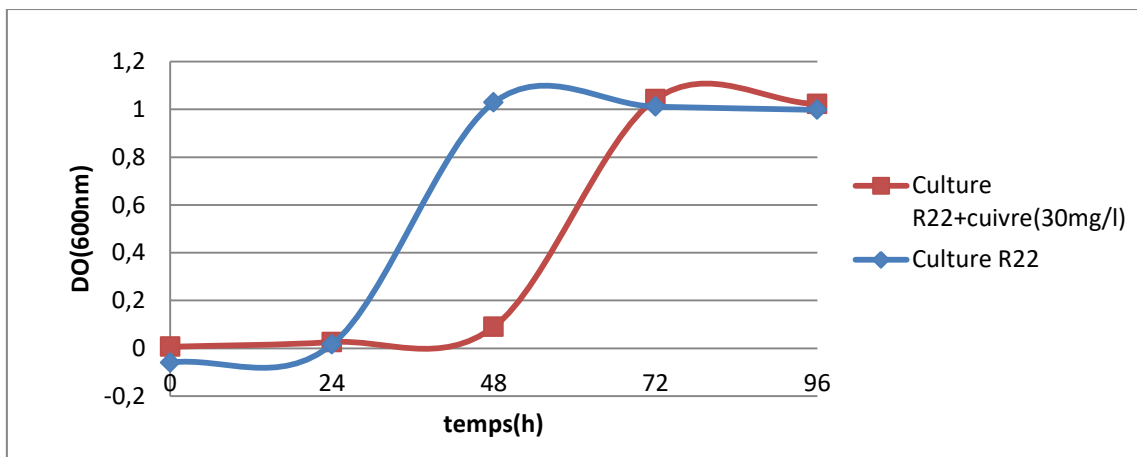


Figure 5 : Cinétique de croissance de la souche **R22** dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

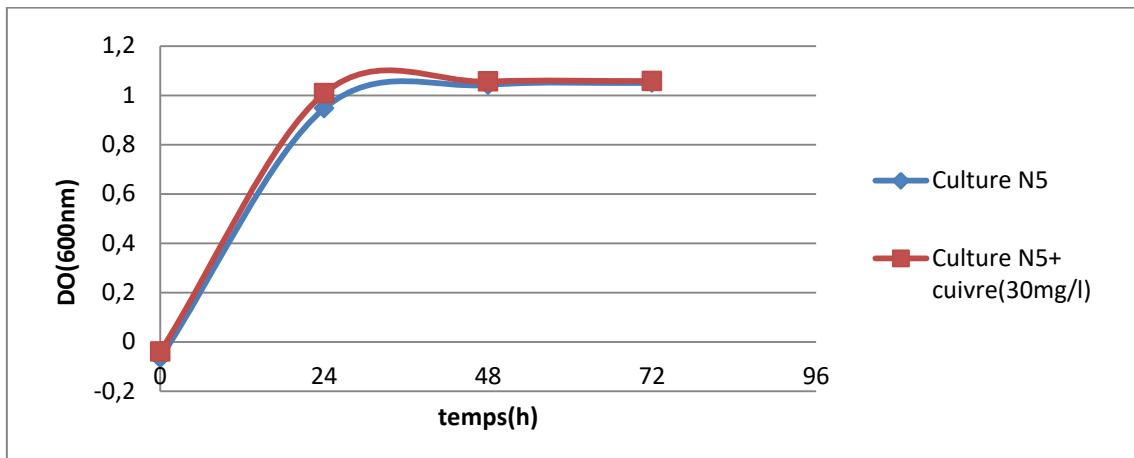


Figure 6 : Cinétique de croissance de la souche **N5** dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

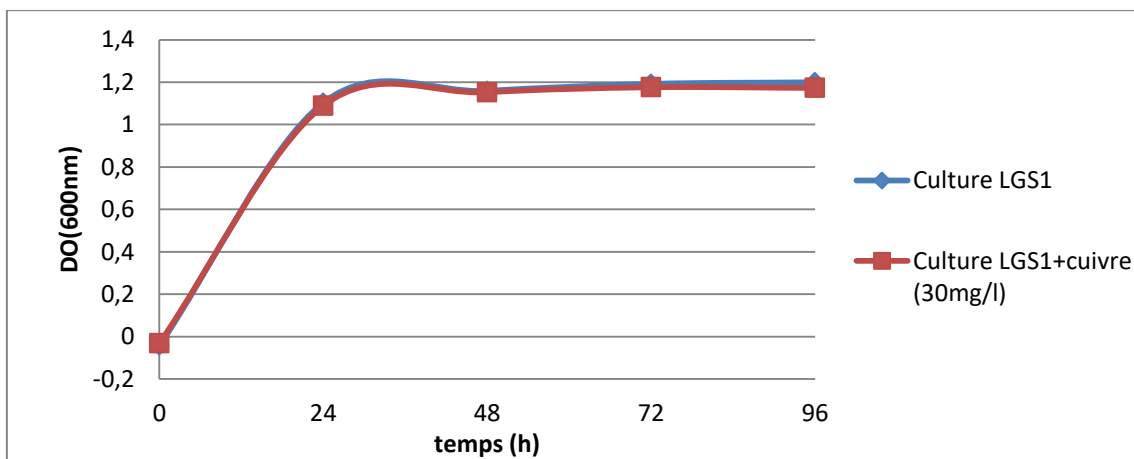


Figure 7 : Cinétique de croissance de la souche **LGS1** dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

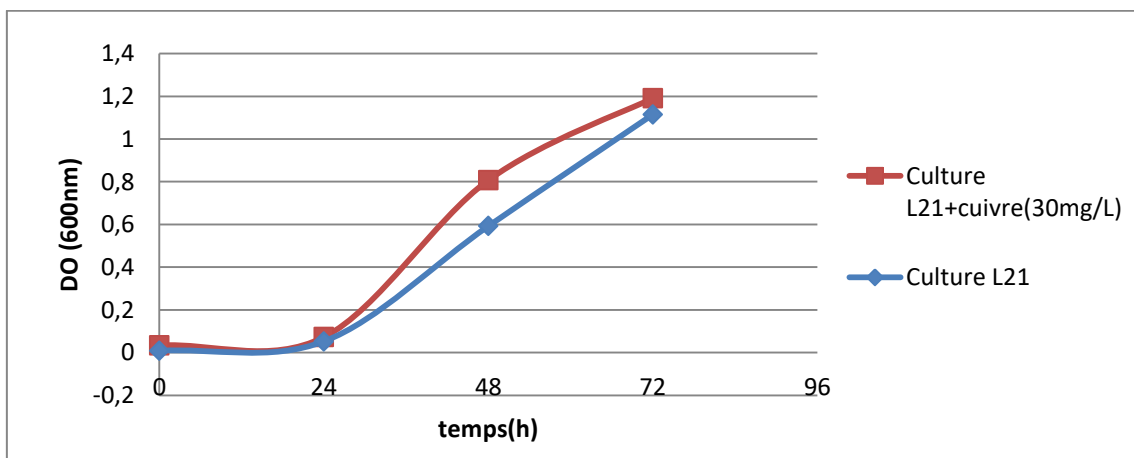


Figure 8 : Cinétique de croissance de la souche **L21** dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

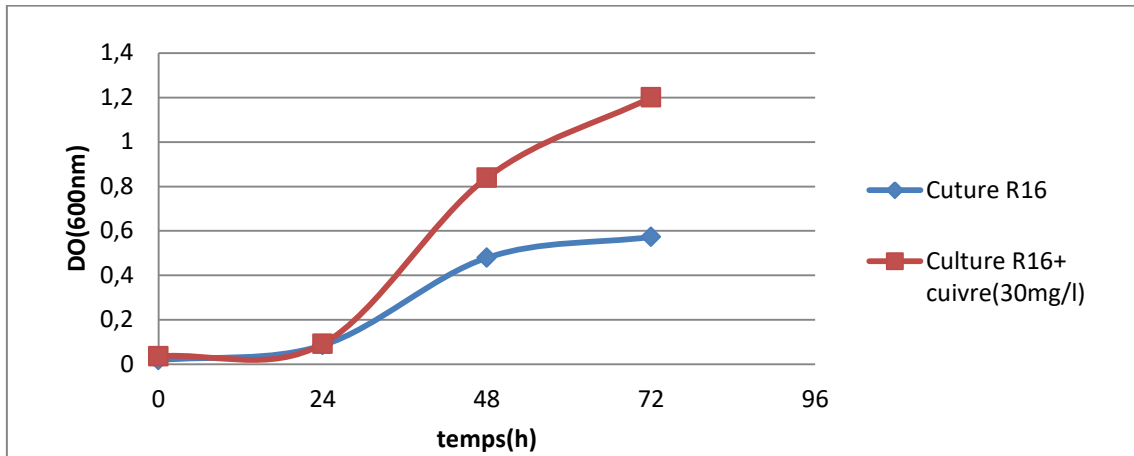


Figure 9 : Cinétique de croissance de la souche **R16** dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

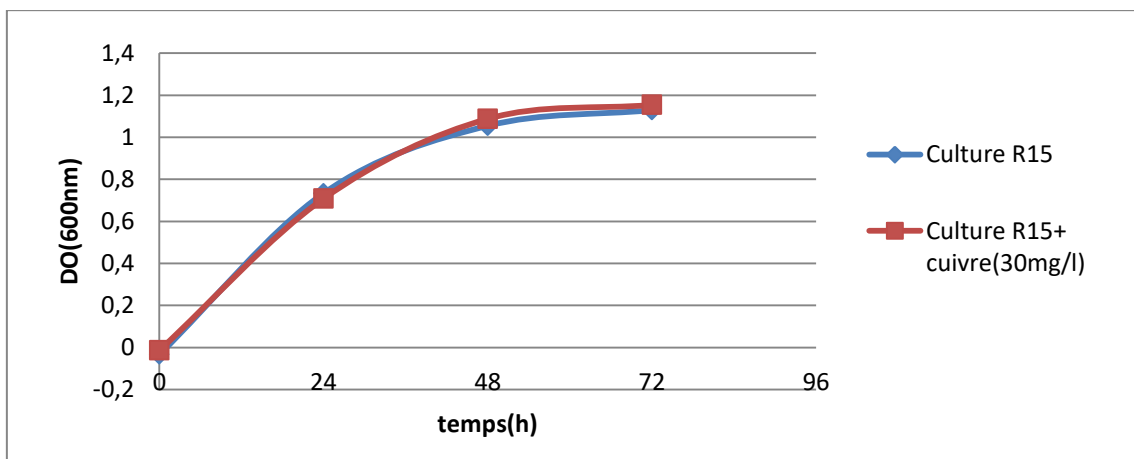


Figure 10 : Cinétique de croissance de la souche **R15** dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

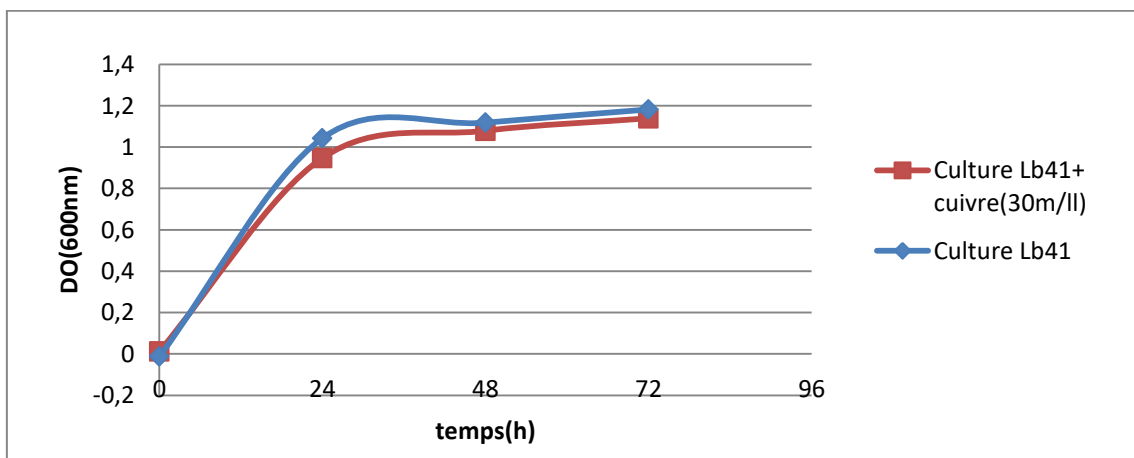


Figure 11 : Cinétique de croissance de la souche **Lb 41** dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

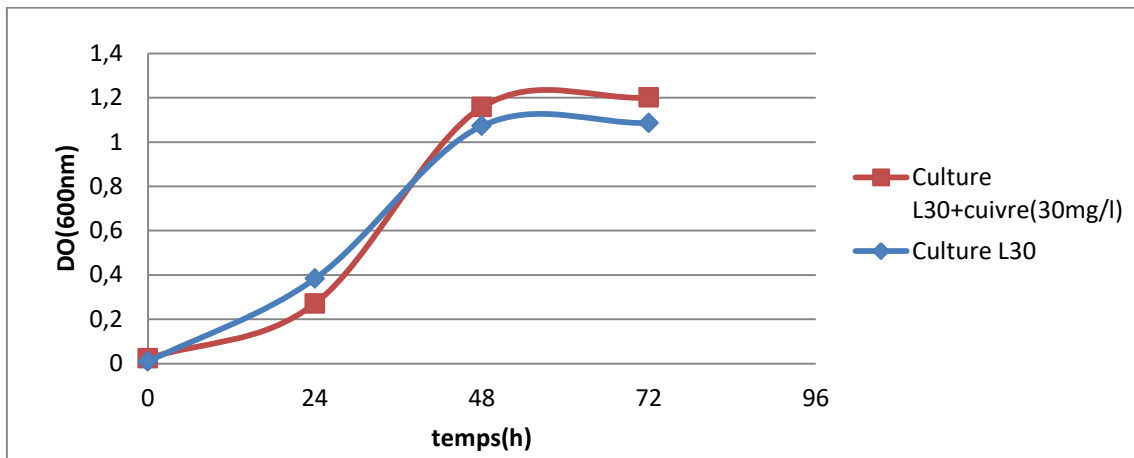


Figure 12 : Cinétique de croissance de la souche L 30 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

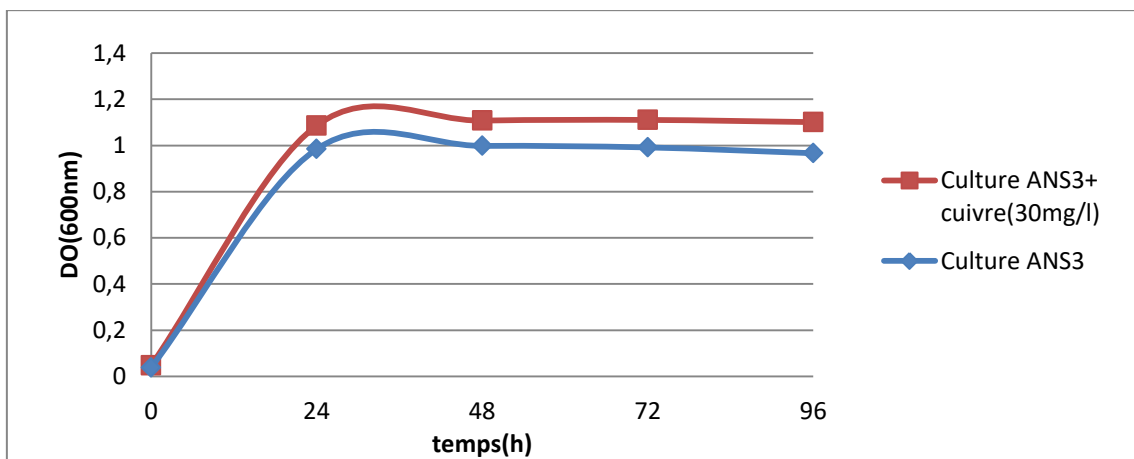


Figure 13 : Cinétique de croissance de la souche ANS3 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

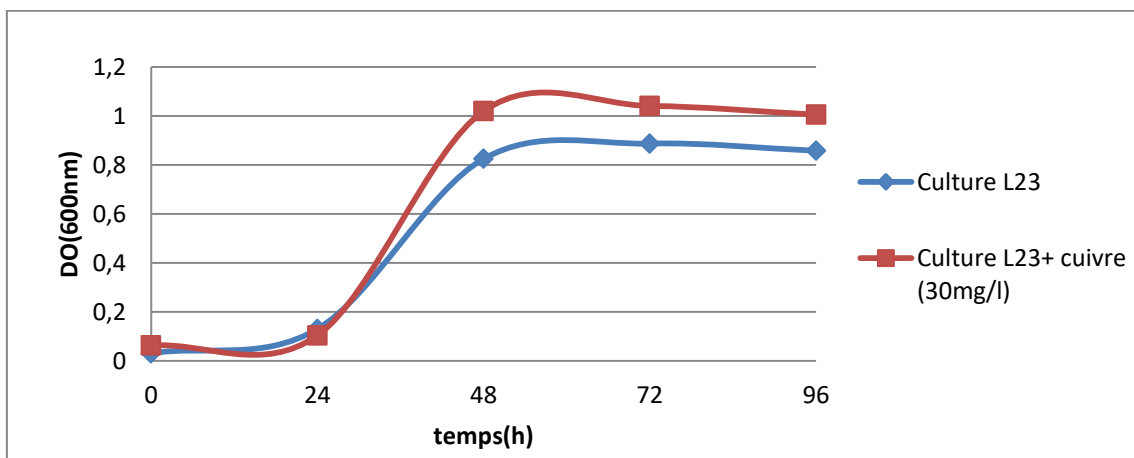


Figure 14 : Cinétique de croissance de la souche L 23 dans le bouillon MRS en présence et en absence du Cu^{+2} .

Tableau 07 : Taux de croissance μ (h^{-1}) des onze souches lactiques en présence et en absence de Cu^{+2} .

Temps (h)		24	48	72	96
Souches					
L 21	Sans Cu^{+2}	15,261	34,761	43,912	/
	Avec Cu^{+2}	1,142	11,443	17,119	/
L 23	Sans Cu^{+2}	3,163	12,721	9,143	6,623
	Avec Cu^{+2}	2,445	16,44	11,191	8,089
L 30	Sans Cu^{+2}	42,988	61,149	41,256	/
	Avec Cu^{+2}	10,933	24,988	17,301	/
LS2	Sans Cu^{+2}	15,125	8,031	4,69	/
	Avec Cu^{+2}	18,464	9,783	6,527	/
ANS3	Sans Cu^{+2}	24,574	12,464	8,251	6,025
	Avec Cu^{+2}	21,873	11,161	7,461	5,545
LGS1	Sans Cu^{+2}	27,01	14,169	9,705	7,323
	Avec Cu^{+2}	35,798	18,912	12,858	9,619
Lb 41	Sans Cu^{+2}	84,43	45,208	31,84	/
	Avec Cu^{+2}	79,262	45,207	31,838	/
N5	Sans Cu^{+2}	15,325	8,382	5,628	/
	Avec Cu^{+2}	26,202	13,697	9,148	/
R15	Sans Cu^{+2}	22,889	16,237	11,566	/
	Avec Cu^{+2}	52,686	40,189	28,401	/
R16	Sans Cu^{+2}	3,618	12,384	9,931	/
	Avec Cu^{+2}	1,534	11,063	10,682	/
R22	Sans Cu^{+2}	1,274	9,16	6,008	4,45
	Avec Cu^{+2}	3,015	6,4	53,14	39,05

Les courbes représentées dans les **figures (4-14)** montrent l'évolution des biomasses bactériennes (DO à 600 nm) des 11 souches lactiques (LS2, R22, N5, LGS1, R16, L21, Lb41, R15, ANS3, L30 et L23) dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l de cuivre et en fonction du temps.

A partir de ces courbes nous observons une augmentation progressive de la croissance des onze souches, dans laquelle certaines souches (LS2, N5, LGS1, R15, Lb41, ANS3 et L30) n'ayant pas la phase d'adaptation (la phase de latence) par contre les souches (L23, R16, R21, R22) ont augmenté

lentement pendant les premières 24 h/48h pour ensuite progresser très rapidement. Les souches testées tolérantes au cuivre suivaient des profils de croissance très similaires à ceux des cultures témoin, pour cela on constate que la concentration 30 mg/l du Cu^{+2} ne présente pas de toxicité sur ces souches lactiques.

Dans une étude similaire à la nôtre, le cuivre a considérablement réduit la viabilité cellulaire, en particulier celle de *Lactobacillus plantarum*. En effet, après 24 h d'incubation en présence de 20 mg/l de cuivre, le nombre de cellules vivantes était négligeable pour toutes les souches testées. Par ailleurs, la concentration des cellules viables de *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus brevis* après 3 h était d'environ 10^6 UFC/ml à 20 mg/l de cuivre (Mrvčić et al., 2009). Pour les mêmes chercheurs, les ions de cuivre étaient très toxiques. Les concentrations (0-500 mg/l) avaient un effet inhibiteur sur la croissance des BL et la production d'acide lactique, en particulier dans des conditions statiques. Le Cu^{+2} à 100 mg/l a entraîné une réduction de la croissance de 5 % pour toutes les bactéries lactiques testées. 50 mg/l de Cu avait réduit de 5 % la croissance et la production d'acide. Parmi les espèces incluses dans cette étude, *Lb. brevis* était la plus résistante aux ions de cuivre à une concentration supérieure à 250 mg/l, sa croissance n'a été réduite que de 25 % (Mrvčić et al., 2013).

D'après ces résultats, on déduit que les onze souches montrent une bonne tolérance à 30 mg/l de cuivre.

Pour déterminer la souche la plus résistante au cuivre on calcule le taux de croissance spécifique pour chaque souche selon la formule décrite précédemment. Les résultats du (Tableau 07) montrent que l'effet du cuivre sur la croissance bactérienne est décrit ainsi :

- Au cours du temps, il y'a un ralentissement de la croissance mais pas une inhibition totale chez les souches LS2, ANS3, Lb41, N5 et R15.
- Il y a une augmentation du taux de croissance au cours du temps chez L23, L30, LGS1, R16 et R22 suivie par une diminution de ce dernier à partir de 48 heures.
- Il y a augmentation du taux de croissance chez L21.

En présence de 30mg/l de cuivre, la souche Lb41 présente un taux de croissance élevé (79.262 h^{-1}), contrairement à la souche L21 qui a un taux de croissance très faible (1.142 h^{-1}).

Les taux de croissance des souches LGS1, Lb41 et R15 étaient plus élevés pour cela elles ont été sélectionnées comme étant les souches les plus résistantes en présence de 30mg/l du cuivre.

Pandit et al., (2013) ont trouvé que le taux de croissance de *Bacillus cereus* n'était pas très affecté par la présence du cuivre. L'étude a montré que les isolats avaient une grande capacité à tolérer ce métal et par conséquent, ces isolats peuvent être utilisés dans la biorestauration des effluents d'industries contaminés par les métaux lourds.

IV. Screening des souches bactériennes productrices des EPS

Looijesteijn *et al.*, (2001) montre que la présence d'EPS a partiellement aboli l'effet du cuivre sur la croissance de *Lactococcus lactis*. La souche MG1614 n'était pas capable de croître dans un milieu avec une concentration de 1,4 mM de CuSO₄, alors que la souche parentale productrice d'EPS pouvait encore croître à cette concentration de cuivre. La présence d'EPS et d'EPS associés aux cellules en suspension a entraîné une tolérance accrue au cuivre. Cependant, il n'a pas été possible, jusqu'à présent, d'augmenter la production d'EPS en utilisant la présence de cuivre comme facteur inducteur.

Pour cette raison on réalise le screening des souches bactériennes productrices des EPS afin d'évaluer la capacité des onze souches lactiques à résister au cuivre.

L'inspection visuelle des colonies visqueuses ou mucoïdes a été faite sur milieu solide qui est couramment utilisé pour identifier la production des EPS (Bancalari *et al.*, 2019). Les 11 souches sont capables de croître sur gélose hypersaccharosée dont la production d'EPS se traduit par l'apparition des colonies visqueuses et gluantes (Photo 5), les souches (LS2, ANS3, LGS1, R15 et R16) se sont révélées les plus productrices des EPS (tableau 08).

N'tcha *et al.*, (2016) ont trouvé cinq souches de bactéries lactiques *Enterococcus faecium*, *Lb fermentum*, *Lb casei*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Streptococcus thermophilus* qui forment des colonies larges et visqueuses indiquant la production des EPS.



Photo n° 5 : Aspect des colonies de quelques souches lactiques sur gélose hypersaccharosée

Tableau 08 : Résultats du test de production des EPS sur gélose hypersaccharosée.

Souche	Résultat
L21	++
L23	++
L30	++
LS2	+++
ANS3	+++
LGS1	+++
Lb41	+
N5	+
R15	+++
R16	+++
R22	+

+++ : Production élevée d'EPS

++ : production d'EPS intermédiaire

+ : faible production d'EPS

A travers ce screening et en se basant sur les taux de croissance les plus élevés à 24h, nous avons sélectionné trois souches lactiques R15, LGS1 et Lb41 pour réaliser les autres tests.

La quantification des EPS a été estimée en procédant à la méthode au phénol-acide sulfurique par l'utilisation du glucose comme standard (**Annexe 09**). (**Figure 15**)

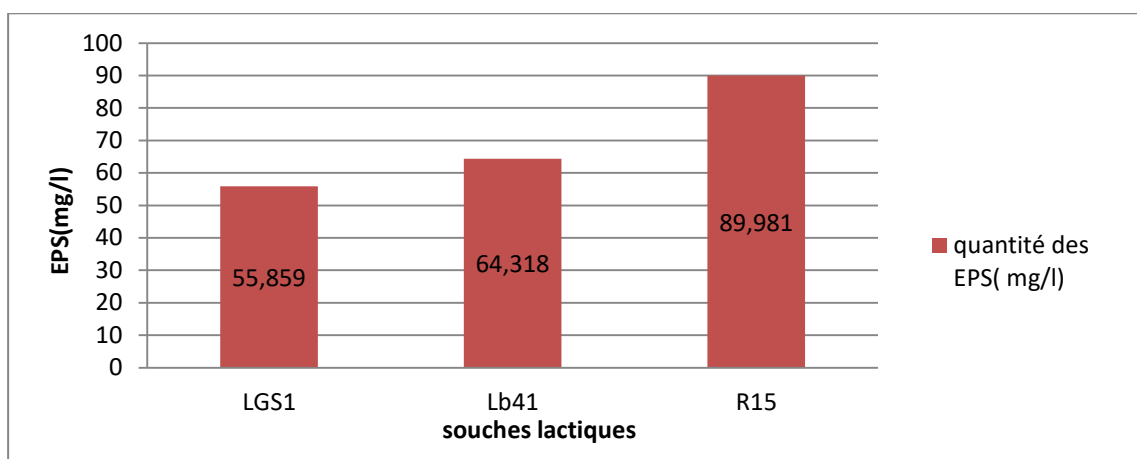


Figure 15 : La quantité des EPS (mg/l) des trois souches lactiques isolées du lait et dérivés sur bouillon hypersaccharosé.

Dans notre étude, la quantité d'EPS produite varie d'une souche à l'autre (**annexe 10**). Les différences de production d'EPS par les trois souches sélectionnées ne sont pas assez importantes

(entre 55.859 et 89.981 mg/l). La souche R15 a été la meilleure souche productrice d'EPS avec une production maximale de 89.981 mg/l par rapport aux souches Lb41 et LGS1 qui étaient les souches les moins productrices d'EPS avec des concentrations de 64.318 mg/l et 55.859 mg/l, respectivement. **Adelekan et al., (2020)** ont obtenu un taux supérieur de production d'EPS par *Lb. plantarum* qui était égal à 208.5 mg/l et un taux inférieur à 127.4 mg/l par *Lb. delbrueckii*. Par ailleurs, **N'tcha et al., (2016)** ont trouvé une production plus importante chez *Lb. casei* avec un taux de 1130 mg/l. De plus, **Mostefaoui et al., (2014)** ont trouvé que 96.66 % des souches des bactéries lactiques sélectionnées produisaient des EPS avec plus de 100 mg/l. Le rendement en EPS chez *Lactobacillus* était entre 160 et 740 mg/l, celui de *Streptococcus* entre 126-319 mg/l, celui de *Enterococcus* entre 70-242 mg/l et celui de *Pediococcus* entre 132-134 mg/l.

Les souches R15 et LGS1 montrent une forte production sur milieu solide et la souche Lb41 a une faible production. Par ailleurs, sur le milieu liquide la souche R15 garde sa forte productivité mais la production des EPS chez la souche LGS1 diminue, par contre, elle augmente chez la souche Lb41.

La plupart des bactéries produisent des EPS dans toutes les conditions, mais les quantités et la composition d'EPS dépend de la souche et est affectée par la nutrition et les conditions culturelles (**Xu et al., 2010**).

Cette différence de production peut être due aux conditions de culture comme la température, le pH ou la composition du milieu ou au comportement des souches sur ces milieux (**Seesuriyachan et al., 2014**), la méthode d'extraction ou encore de la méthode de quantification qui ne sont pas toujours idéales, mais peut-être aussi aux souches qui ne sont pas hyper-productrices (**Mostefaoui et al., 2014**).

Des études sur la production et la localisation des polysaccharides chez *Lb plantarum* ont montré que les polymères étaient synthétisés pendant la phase de croissance exponentielle et que le polymère EPS-b a été progressivement libéré dans le milieu de culture au cours de la phase stationnaire de croissance (**Tallon et al., 2013**).

V. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Les **tableaux 09, 10 et 11** représentent l'évolution de la croissance des souches R15, LGS1 et Lb41 en présence de concentrations croissantes en Cu^{2+} , chaque valeur est déterminée par la différence entre la croissance cellulaire au temps initial (t_{0h}) et après 24 heures (t_{24h}). D'après les résultats, nous remarquons que l'augmentation de la concentration du Cu^{2+} affecte considérablement la croissance des souches sélectionnées car elle provoque un ralentissement de la croissance bactérienne, on peut constater aussi que les fortes concentrations de cuivre présentent une toxicité et inhibent les souches complètement. Les résultats montrent que la CMI est de 150

mg/l pour les trois souches, ce qui signifie que les souches ont une résistance naturelle modérée. Donc il y a un ralentissement de la croissance proportionnel à la concentration croissante du cuivre.

Tableau 09 : Détermination de la CMI de la souche LGS1.

Concentration de Cu ⁺² (mg/l)	La souche LGS1		
	DO _{T0h}	DO _{T24h}	(DO _{T24h} - DO _{T0h})
50	0.43	0.6152	0.1852
100	0.0218	0.0418	0.02
150	0.0215	0.0081	-0.0134
200	0.0063	-0.0197	-0.026
250	-0.0022	-0.0169	-0.0147
300	0.0149	-0.0011	-0.016
350	0.0106	-0.0290	-0.0396
400	0.0162	-0.0244	-0.0406

Tableau 10 : Détermination de la CMI de la souche Lb41.

Concentration de Cu ⁺² (mg/l)	La souche Lb41		
	DO _{T0h}	DO _{T24h}	(DO _{T24h} - DO _{T0h})
50	-0.0002	0.42	0.4202
100	0.0350	0.0534	0.0184
150	0.0250	-0.0414	-0.0664
200	0.0196	-0.0276	-0.0472
250	0.0042	-0.0696	-0.0738
300	-0.0039	-0.0254	-0.0215
350	0.0198	-0.0425	-0.0623
400	-0.0002	-0.0159	-0.0139

Tableau 11 : Détermination de la CMI de la souche R15.

Concentration de Cu ⁺² (mg/l)	La souche R15		
	DO _{T0h}	DO _{T24h}	(DO _{T24h} - DO _{T0h})
50	-0.0222	0.445	0.4672
100	-0.0335	0.0547	0.0882
150	-0.0106	-0.0748	- 0.0642
200	-0.0348	-0.0734	- 0.0386
250	-0.0273	-0.0917	- 0.0644
300	-0.0276	-0.0614	- 0.0338
350	-0.0146	-0.0951	- 0.0805
400	-0.0005	-0.0227	- 0.0222

Les résultats de **Pandit et al., (2013)** ont indiqué que la souche *Bacillus. sp* présente une résistance maximale à 400 ppm de Cu et que *Bacillus cereus* était résistante à 200 ppm de cuivre. Les études de **Mrvčić et al., (2013)** ont montré aussi qu'une concentration en Cu de 200 mg/l provoquait une inhibition complète de *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum*, tandis que l'inhibition de la croissance de *L. brevis* à cette concentration était d'environ 50 %.

Par ailleurs, et selon **Rodriguez et Alatossava, (2008)**, la toxicité du cuivre est très spécifique à l'espèce. Ces chercheurs ont testé *Lactobacillus delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus* et *Propionibacterium freudenreichii* où *L. delbrueckii* était la plus résistante au cuivre montrant une inhibition de la croissance en présence de seulement 30 ppm de cuivre.

Les études de **Tian et al., (2015)** ont indiqué que *Lb plantarum* CCFM39, *Lb. casei* CCFM 38, *Lb. bulgaricus* CCFM 24, *Lb. acidophilus* CCFML a et *Lb. thermophilus* CCFM32, étaient très sensibles au cuivre et qu'ils ne pouvaient généralement pas croître dans un bouillon MRS contenant des concentrations d'ions de cuivre de 50 mg/L.

VI. Test d'élimination du cuivre

Le test d'élimination du Cu permet d'étudier la capacité des souches sélectionnées LGS1, Lb41 et R15 d'éliminer le Cu dans le bouillon MRS à une concentration égale à 50 mg/l, la concentration du Cu éliminé est déterminée par la SAA chaque 24h durant 72h (Annexe 11) et la cinétique de croissance des souches en présence de 50 mg/l de Cu par le spectrophotomètre à 600 nm (Annexe 12).

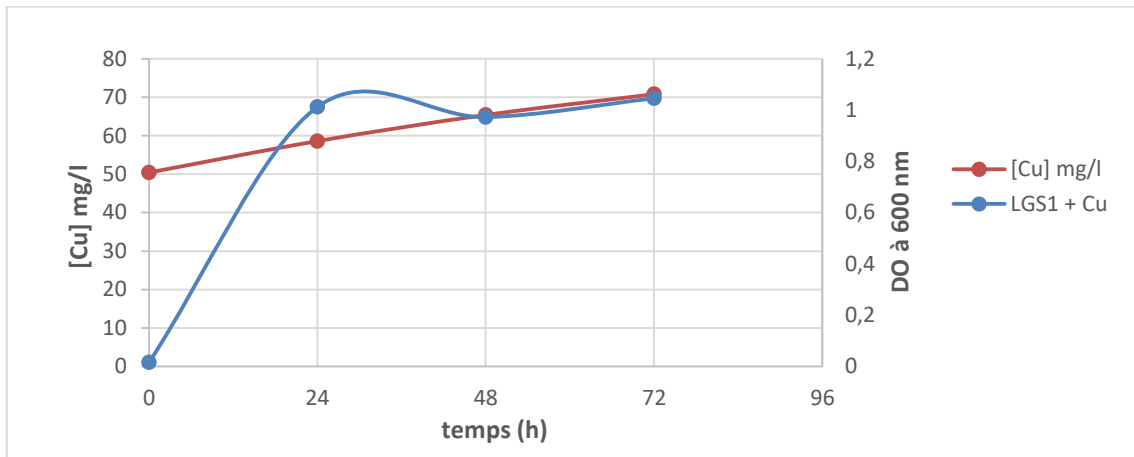


Figure 16 : Evolution de la concentration du Cu dans le temps et cinétique de la croissance de la souche **LGS1** dans le bouillon MRS en présence (50mg/l) du Cu.

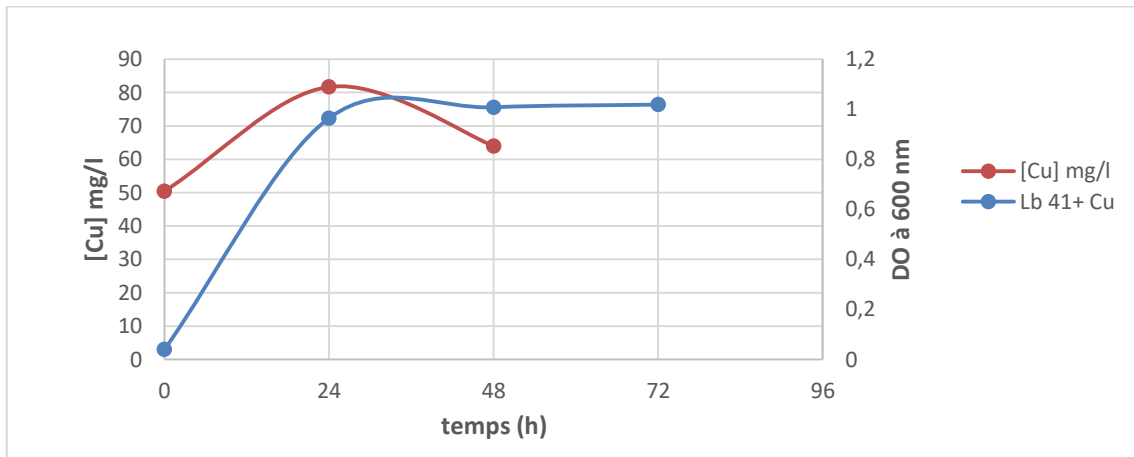


Figure 17 : Evolution de la concentration du Cu dans le temps et cinétique de la croissance de la souche **Lb 41** dans le bouillon MRS en présence (50mg/l) du Cu.

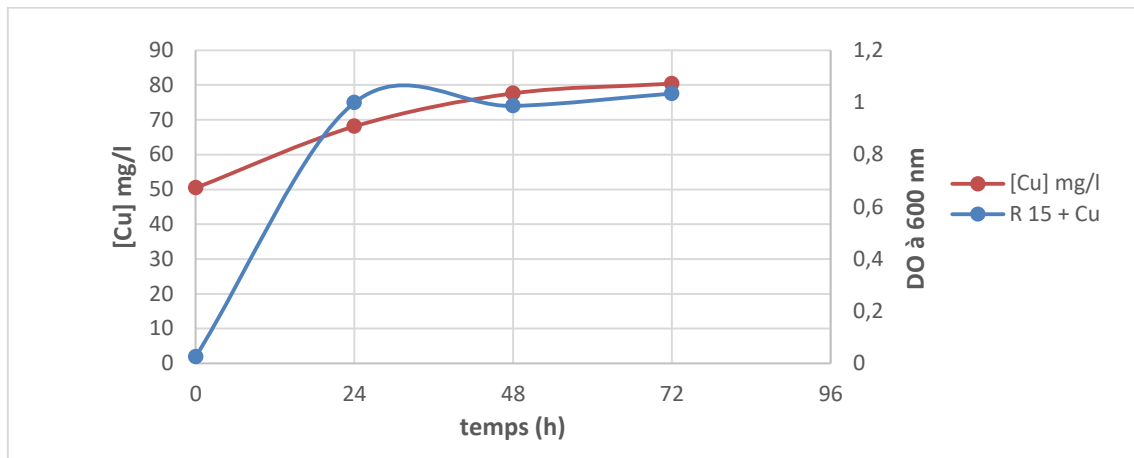


Figure 18 : Evolution de la concentration du Cu dans le temps et cinétique de la croissance de la souche **R 15** dans le bouillon MRS en présence (50mg/l) du Cu.

Les figures 16, 17 et 18 représentent l'évolution de la concentration du Cu dans le temps en présence des trois souches et l'évolution de la biomasse bactérienne. A partir de ces figures nous observons qu'il y a une augmentation de la concentration du Cu pendant les 72 h d'incubation à 37°C pour atteindre 70.8 mg/L chez LGS1 et 80.4 mg/L chez R15 avec une augmentation de la biomasse cellulaire dans le milieu pour les deux souches. Par ailleurs, avec la souche Lb41, la concentration du Cu augmente durant les premières 24h et atteint 81.7 mg/L puis elle diminue jusqu'à 68.1 mg/L à 48 h, par contre, la biomasse cellulaire augmente au cours du temps.

L'augmentation de la concentration en cuivre n'est pas explicable, elle pourrait être due à une erreur de lecture du spectromètre à absorption atomique. Si le taux était inchangé on aurait attribué cet effet à un efflux des ions cuivreux. D'ailleurs, **Mrvčić et al., (2013)** ont constaté que les BL disposaient de systèmes de transport de cuivre qui permettent la diminution de l'accumulation de ce métal par le mécanisme d'efflux ou d'exclusion.

De même, **Lee et al., (2005)** ont indiqué que *Lb. casei* KCTC 3260 avait le niveau le plus élevé d'activité de chélation pour les ions de Cu^{+2} à 21,8 ppm.

La culture mixte de *Lb. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* avaient montré une capacité maximale d'éliminer 93% du cuivre après 4 jours. Ces résultats suggèrent que ce processus est le plus efficace pour extraire les métaux lourds du bois traité à l'arsenic chrome cuivre (ACC) (**Chang et al., 2012**).

Dans une autre étude, **Schut et al., (2011)** ont trouvé que la plus haute capacité de liaison des bactéries lactiques testées a été trouvée pour *Lb. buchneri* avec un maximum de 46.17 μg de Cu lié par mg de cellule dans l'eau déminéralisée.

Plus récemment, **Sizentsov et al., (2018)** ont étudié la capacité de bioaccumulation du cuivre par des souches lactiques isolées de l'intestin des poulets pour évaluer leur fonction protectrice contre

l'intoxication au cuivre *in vivo*. Les résultats ont indiqué que les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* avaient une capacité de bioaccumulation de cuivre de 3.1 et 8.2%, respectivement.

Conclusion

Cette étude avait pour but d'étudier la capacité des souches lactiques isolées du lait, du L'ben et du Raib à tolérer la présence du cuivre dans le milieu MRS. Dans la partie expérimentale, nous avons commencé par isoler des BL à partir du lait et dérivés et les identifier en se basant sur les caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques. Par la suite, nous avons évalué la capacité des BL isolées de résister et de tolérer la présence du cuivre dans le bouillon MRS et de produire les EPS sur le milieu hypersaccharosé. Parmi les onze souches lactiques isolées, les souches qui poussaient le mieux en présence de l'ion métallique et les plus productrices des EPS ont été sélectionnées pour déterminer la CMI du cuivre sur milieu liquide et pour tester leur capacité à l'éliminer.

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure :

- Que les souches lactiques L21, L23, N5, L30, Lb41, R22, R15 et R16 appartiennent au genre *Leuconostoc*, LS2 et ANS3 appartiennent au genre *Lactobacillus* et LGS1 appartient au genre *Enterococcus*.
- Que les onze souches de BL isolées tolèrent la présence du cuivre dans le milieu, et que leur croissance cellulaire n'est pas influencée par les faibles concentrations du cuivre 30 mg/L.
- Que les onze souches de BL isolées produisent des EPS.
- Que la souche *Leuconostoc sp.* (R15) est capable de produire des quantités élevées d'EPS, 89.981 mg/l d'où la possibilité de leur implication dans la biosorption des ions métalliques.
- Que les souches *Leuconostoc sp.* (R15 et Lb41) et *Enterococcus sp.* (LGS1) isolées du Raib et du l'ben sont capables de tolérer la présence du cuivre dans le milieu avec une concentration minimale inhibitrice de 150mg/l, ce qui laisse supposer que cette résistance est naturellement présente.

La capacité des bactéries lactiques à tolérer la présence de concentrations plus importantes de cuivre dans le milieu doit être recherchée, pour être exploitée dans le domaine environnemental et surtout dans les processus de bioremédiation des métaux lourds afin de diminuer leur risque pour les êtres vivants.

Références bibliographiques

A

- Abicht, H. K., Gonskikh, Y., Gerber, S. D., & Solioz, M. (2013).** Non-enzymic copper reduction by menaquinone enhances copper toxicity in *Lactococcus lactis* IL1403. *Microbiology*, 159(Pt_6), 1190-1197. <https://doi.org/10.1099/mic.0.066928-0>
- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M... & Azabou, S. (2018).** Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108(1), 719-728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.155>
- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Sarzanin, C., & Mentasti, E. (2003).** Adsorption of heavy metals on Na-montmorillonite. Effect of pH and organic substances. *Water Research*, 37(7), 1619-1627. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00524-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00524-9)
- Adelekan, A. O., Olurin, T. O., & Ezeani, A. O. (2020).** Antioxidant Activities of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Commercial Yoghurt Samples. *Advances in Microbiology*, 10(08), 359. DOI: [10.4236/aim.2020.108026](https://doi.org/10.4236/aim.2020.108026)
- Adjiri, O. A., Gone, D. L., Kouame, I. K., Kamagate, B., & Biemi, J. (2008).** Caractérisation de la pollution chimique et microbiologique de l'environnement de la décharge d'Akouédo, Abidjan-Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2(4), 401-410.
- Ahirwar, S.S., Gupta, G., Singh, V & Gupta, V., (2017).** Comparative study of *lactobacillus* species in dental caries active subjects. *Asian Journal of Science and Technology* 08(10), 5986-5991.
- Ahmed, N., Nawaz, A., & Badar, U. (2005).** Screening of copper tolerant bacterial strains and their potential to remove copper from the environment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 74(2), 219-226. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0573-z>
- Ahuja, S., (2009).** Handbook of Water Purity and Quality (1st ed.). Academic Press Inc. ISBN: 978-0-12-374192.
- Alegría, Á., Delgado, S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2013).** Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc spp.* strains from traditional, starter-free cheeses. *Dairy Science & Technology*, 93(6), 657-673. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0128-3>
- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M.,... & Chevallier, I. (2005).** Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale

facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22(5), 373-382. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.11.005>

Ancion, P. Y., Lear, G., Dopheide, A., & Lewis, G. D. (2013). Metal concentrations in stream biofilm and sediments and their potential to explain biofilm microbial community structure. *Environmental Pollution*, 173(1), 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.012>

Ao, X., Zhang, X., Shi, L., Zhao, K., Yu, J., Dong, L., ... & Cai, Y. (2012). Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1073-1084. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4224>

Argun, M. E., Dursun, S., Ozdemir, C., & Karatas, M. (2007). Heavy metal adsorption by modified oak sawdust: Thermodynamics and kinetics. *Journal of hazardous materials*, 141(1), 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.095>

Ashish, B., Neeti, K., & Himanshu, K. (2013). Copper toxicity: a comprehensive study. *Research Journal of Recent Sciences*, 2(ISC-2012), 58-67.

Azzaoui, S., Hanbali, M. E., & Leblanc, M. (2002). Note technique—Cuivre, plomb, fer et manganèse dans le bassin versant du Sebou ; Sources d'apport et impact sur la qualité des eaux de surface. *Water Quality Research Journal*, 37(4), 773-784. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2002.052>

B

Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D. E., & Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21(5), 579-588. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.006>

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales " Arabia et kabyle". *Sciences & Amp; Technologie. C, Biotechnologies*, 51(23), 30-37.

Bai, L. J., Wang, L., & Ji, S. J. (2016). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharide from *L. helveticus* SMN2-1. *Chemical Engineering Transactions*, 55(1), 61-66.

Bancalari, E., D'Incecco, P., Sardaro, M. L. S., Neviani, E., Pellegrino, L., & Gatti, M. (2019). Impedance microbiology to speed up the screening of lactic acid bacteria exopolysaccharide production. *International Journal of Food Microbiology*, 306(1), 108268. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108268>

Bendaho, D., Ainad Tabet, D., Bassou, D. (2014). Adsorption du cuivre Cu (II) en solution par l'argile brute et activée de la région de Tiout-Naama sud-ouest algérien. *Science des Matériaux (Laboratoire LARHYSS)*, 2(1), 23-34.

Bennani, S., Mchiouer, K., Rokni, Y., & Meziane, M. (2017). Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from Moroccan raw cow's milk. *Journal of Material and Environmental Sciences*, 8(1), 4934-4944.

Bestawy, E. E., Helmy, S., Hussien, H., Fahmy, M., & Amer, R. (2013). Bioremediation of heavy metal-contaminated effluent using optimized activated sludge bacteria. *Applied Water Science*, 3(1), 181-192. <https://doi.org/10.1007/s13201-012-0071-0>

Bhaskar, P. V., & Bhosle, N. B. (2006). Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environment International*, 32(2), 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.010>

Bigalke, M., Weyer, S., & Wilcke, W. (2011). Stable Cu isotope fractionation in soils during oxic weathering and podzolization. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(11), 3119-3134. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.03.005>

Bohli, T., Villaescusa, I., & Ouederni, A. (2013). Comparative study of bivalent cationic metals adsorption Pb (II), Cd (II), Ni (II) and Cu (II) on olive stones chemically activated carbon. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 4(4), 1-7.

Bruce, J., MacKenzie, F. M., Cookson, B., Mollison, J., Van der Meer, J. W., Krcmery, V., & Gould, I. M. (2009). Antibiotic stewardship and consumption: findings from a pan-European hospital study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(4), 853-860. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp268>

C

Cameselle, C., & Gouveia, S. (2019). Phytoremediation of mixed contaminated soil enhanced with electric current. *Journal of Hazardous Materials*, 361(1), 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.062>

Chang, Y. C., Choi, D., & Kikuchi, S. (2012). Enhanced extraction of heavy metals in the two-step process with the mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Bioresource Technology*, 103(1), 477-480. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.059>

- Cheraghi, M., Lorestani, B., Khorasani, N., Yousefi, N., & Karami, M. (2011).** Findings on the phytoextraction and phytostabilization of soils contaminated with heavy metals. *Biological Trace Element Research*, 144(1), 1133-1141. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8359-0>
- Chillappagari, S., Miethke, M., Trip, H., Kuipers, O. P., & Marahiel, M. A. (2009).** Copper acquisition is mediated by YcnJ and regulated by YcnK and CsoR in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 191(7), 2362-2370. <https://doi.org/10.1128/JB.01616-08>
- Chui, S. H., Wong, Y. H., Chio, H. I., Fong, M. Y., Chiu, Y. M., Szeto, Y. T... & Lam, C. W. K. (2013).** Study of heavy metal poisoning in frequent users of Chinese medicines in Hong Kong and Macau. *Phytotherapy Research*, 27(6), 859-863. <https://doi.org/10.1002/ptr.4816>
- Chun-lei, Z., Jia-qi, L., Hai-tao, G., Jie, W., & Ri-hua, X. (2014).** Odabir sojeva bakterija mliječne kiseline sa sposobnošću proizvodnje egzopolisaharida izoliranih iz tradicionalnog jogurta regije Inner-Mongolija. *Mljekarstvo: Časopis za Unaprjeđenje Proizvodnje i Prerade Mlijeka*, 64(4), 254-260. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2014.0404>
- Clausen, C. A. (2000).** Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. *Waste management & Research*, 18(3), 264-268. <https://doi.org/10.1177/0734242X0001800308>
- Cloutier, F., Jalby, G., Lessard, P., & Vanrolleghem, P. (2009).** Modélisation dynamique du comportement des métaux lourds dans des stations d'épuration. *Revue des Sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 22(4), 461-471. <https://doi.org/10.7202/038325ar>
- Colombo, M., Brown, K. A., De Vera, J., Bergquist, B. A., & Orians, K. J. (2019).** Trace metal geochemistry of remote rivers in the Canadian Arctic Archipelago. *Chemical Geology*, 525(1), 479-491. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2019.08.006>
- Costa, A. C. A. D., & Duta, F. P. (2001).** Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(1), 1-5. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100001>

D

- Dahou, A., Homrani, A., Bensaleh, F., & Medjahed, M. (2015).** La microflore lactique d'un fromage traditionnel Algérien «type j'ben»: connaissance des écosystèmes microbiens laitiers locaux et de leurs rôles dans la fabrication des fromages. *Afrique Science*, 11(6), 1-13.

- De Jonge, M., Van de Vijver, B., Blust, R., & Bervoets, L. (2008).** Responses of aquatic organisms to metal pollution in a lowland river in Flanders: a comparison of diatoms and macroinvertebrates. *Science of the Total Environment*, 407(1), 615-629. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.020>
- De Mora, A. P., Ortega-Calvo, J. J., Cabrera, F., & Madejón, E. (2005).** Changes in enzyme activities and microbial biomass after “in situ” remediation of a heavy metal-contaminated soil. *Applied soil ecology*, 28(2), 125-137. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.07.006>
- De Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Silva, L. F., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., & Penna, A. L. B. (2015).** *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*, 65(2), 899-910. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0933-9>
- Dell’Amico, E., Cavalca, L., & Andreoni, V. (2005).** Analysis of rhizobacterial communities in perennial Graminaceae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 52(2), 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.11.005>
- Dimon, F., Dovonou, F., Adjahossou, N., Chouti, W., Mama, D., Alassane, A., & Boukari, M. (2014).** Caractérisation physico-chimique du lac Ahémé (Sud Bénin) et mise en relief de la pollution des sédiments par le plomb, le zinc et l’arsenic. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 37(1), 36-42.
- Djeffal, L. (2008).** Elimination, par adsorption sur argile locale, des ions métalliques contenus dans les eaux de rejet industriel de la région d’Annaba. Thèse de doctorat, Université Badji- Mokhtar, Annaba.
- Djorfi, S., Foufou, A., Majour, H., Belloulou, L., Hani, A., & Djabri, L. (2010).** Impact de la décharge publique de Annaba sur la qualité des eaux de la plaine de l’Oued Zied. *Communication Science & Communication Technologie*, 34(8), 151-157.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(1), 350e356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Durve, A., Naphade, S., Bhot, A., Varghese, J., & Chandra, N. (2013).** Quantitative evaluation of heavy metal bioaccumulation by microbes. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3(1), 21-32.

F

Fan, W., Zhang, Y., Liu, S., Li, X., & Li, J. (2020). Alleviation of copper toxicity in *Daphnia magna* by hydrogen nanobubble water. *Journal of Hazardous Materials*, 389(1), 122155. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122155>

Felz, S., Vermeulen, P., Van Loosdrecht, M. C., & Lin, Y. M. (2019). Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). *Water Research*, 157(1), 201-208.

Focardi, S., Pepi, M., Focardi, S. E. (2013). Microbial Reduction of Hexavalent Chromium as a Mechanism of Detoxification and Possible Bioremediation Applications. *Biodegradation- life of Science*, 41(1), 322-347. <https://doi.org/10.5772/56365>

G

Ghaedi, A. M., Ghaedi, M., Vafaei, A., Irvani, N., Keshavarz, M., Rad, M & Gupta, V. K. (2015). Adsorption of copper (II) using modified activated carbon prepared from Pome granate wood: Optimization by bee algorithm and response surface methodology. *Journal of Molecular Liquids*, 206(1), 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.02.029>

Gherib, A., Boufendi, M., Temime, A., & Bedouh, Y. (2016). Applications of phytoremediation in wastewater treatment in Algeria. *LARHYSS Journal P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2521-9782*, 33(27), 23-37.

Ghosh, A., Ali, S., Mukherjee, S. K., Saha, S., & Kaviraj, A. (2020). Bioremediation of copper and nickel from freshwater fish *Cyprinus carpio* using rhizoplane bacteria isolated from *pistia stratiotes*. *Environmental Processes*, 7(1), 443-461. <https://doi.org/10.1007/s40710-020-00436-5>

Ghuniem, M. M., Khorshed, M. A., & Souaya, E. R. (2019). Method validation for direct determination of some trace and toxic elements in soft drinks by inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 99(6), 515-540. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1599878>

Grigalaviciene, I., Rutkoviene, V., & Marozas, V. (2005). The Accumulation of Heavy Metals Pb, Cu and Cd at Roadside Forest Soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(1). 109-115.

Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A., & Baudu, M. (2003). Relation between extracellular polymers composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere*, 52(10), 1701-1710. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00355-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00355-2)

Guinée, J., van Oers, L., de Koning, A., & Tamis, W. (2006). Life cycle approaches for Conservation Agriculture. *Chronic myeloid leukemia report*, 171(1), 708-711.

Gybina, A. A., & Prohaska, J. R. (2008). Fructose-2, 6-bisphosphate is lower in copper deficient rat cerebellum despite higher content of phosphorylated AMP-activated protein kinase. *Experimental Biology and Medicine*, 233(10), 1262-1270. <https://doi.org/10.3181/0804-RM-132>

H

Ha, J., Gélabert, A., Spormann, A. M., & Brown Jr, G. E. (2010). Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.06.031>

Halttunen, T., Salminen, S., & Tahvonen, R. (2007). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 114(1), 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040>

Hasr Moradi Kargar, S., & Hadizadeh Shirazi, N. (2020). *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum* bioremediation ability assessment for copper and zinc. *Archives of Microbiology*, 202(1), 1957-1963. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01916-w>

Hashida, M., Semerok, A. F., Gobert, O., Petite, G., & Izawa, Y. (2002). Ablation threshold dependence on pulse duration for copper. *Applied surface science*, 197(1), 862-867. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)00463-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)00463-4)

Hayati, A., Umami, R. D., Wanguyun, A. P., Putra, P. A. D., Taufiq, A. P., & Supriyanto, A. (2020). Toxicity effect of copper on histopathology of *Oreochromis niloticus* liver with diet of lactic acid bacteria. *Ecology, Environment and Conservation*, 26(1), (586-590).

He, L. Y., Zhang, Y. F., Ma, H. Y., Chen, Z. J., Wang, Q. Y., Qian, M., & Sheng, X. F. (2010). Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Applied Soil Ecology*, 44(1), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.09.004>

Hinojosa, M. B., Carreira, J. A., Ruiz, R. G., and Dick R.P.(2004). Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 36(1), 1559-1568. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.003>

Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2004). A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental pollution*, 130(3), 465-476. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.031>

Huët, M. A. L., & Puchooa, D. (2017). Bioremediation of heavy metals from aquatic environment through microbial processes: A potential role for probiotics. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(6), 14-23.

I

Ibrahim, B. S., Abdel-Aziz, M. H., El-Ashtoukhy, E. Z., Zewail, T. M., Zatout, A. A., & Sedahmed, G. H. (2021). Cementation of Copper on Zinc in Agitated Vessels Equipped with Perforated Baffles as Turbulence Promoters. *Mining, Metallurgy & Exploration*, 38(2), 1203-1213. <https://doi.org/10.1007/s42461-020-00375-7>

J

Janas, K. M., Zielińska-Tomaszewska, J., Rybaczek, D., Maszewski, J., Posmyk, M. M., Amarowicz, R., & Kosińska, A. (2010). The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 167(4), 270-276. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.09.016>

Jaouen, K., Pons, M. L., & Balter, V. (2013). Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains. *Earth and Planetary Science Letters*, 374(1), 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2013.05.037>

Jiang, C. Y., Sheng, X. F., Qian, M., & Wang, Q. Y. (2008). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant Burkholderia sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, 72(2), 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.006>

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne, 2011. Décret exécutif du 19 juin. 34, Algérie.

Jordao C.P., Nascentes C.C., Cecon P.R., Fontes R.L.F. and Pereira J.L., (2006). Heavy metal availability in soil amended with composted urban solid wastes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 112(1), 309-326. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-1072-y>

Jung, K., Ok, Y. S., & Chang, S. X. (2011). Sulfate adsorption properties of acid-sensitive soils in the Athabasca oil sands region in Alberta, Canada. *Chemosphere*, 84(4), 457-463. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.034>

K

Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z. & Zhu, Y.G., (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with waste water in Beijing, China. *Environmental Pollution*, 152(1), 686-692. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.056>

Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., ... & Kimura, K. (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in microbiology*, 164(7), 701-709. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.04.004>

Kirillova, A. V., Danilushkina, A. A., Irisov, D. S., Bruslik, N. L., Fakhrullin, R. F., Zakharov, Y. A., ... & Yarullina, D. R. (2017). Assessment of resistance and bioremediation ability of *Lactobacillus* strains to lead and cadmium. *International Journal of Microbiology*, 112(1), 626-642. <https://doi.org/10.1155/2017/9869145>

Kumar, K., Patavardhan, S. S., Lobo, S., & Gonsalves, R. (2018). Equilibrium study of dried orange peel for its efficiency in removal of cupric ions from water. *International Journal of Phytoremediation*, 20(6), 593-598. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1405379>

L

Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., & Zerrouq, F. (2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Afrique Science : Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 10(4), 267-277.

Lee, J., Hwang, K. T., Chung, M. Y., Cho, D. H., & Park, C. S. (2005). Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal ion chelating effect. *Journal of Food Science*, 70(8), m388-m391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11524.x>

Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X., & Dong, M. (2014). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in vitro. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 732-739.

Liu, C., Mao, X. L., Mao, S. S., Zeng, X., Greif, R., & Russo, R. E. (2004). Nanosecond and femtosecond laser ablation of brass: particulate and ICPMS measurements. *Analytical Chemistry*, 76(2), 379-383. <https://doi.org/10.1021/ac035040a>

Looijesteijn, P. J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., & Hugenholtz, J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 71-80. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00437-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00437-2)

M

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., & Sa, T. (2007). Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, 69(2), 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.017>

Menani, M. R., & Zouita, N. (2004). Etude de la pollution de la plaine alluviale d'El Madher par les rejets de la ville de Batna (Nord-Est Algérie). *Colloque International « Terre et Eau »*, 34(1), 80-84.

Manou, B. E., Labite, H., Sohounnon, M., Deguenon, A. Y., & Edoth, A. P. (2020) Évaluation de bioaccumulation des métaux toxiques (Pb, Cu, Mn) dans les espèces de crabes *Callinectes amnicola* et *Cardisoma armatum* consommés avec les légumes d'*Abelmoschus esculentus* dans la basse vallée de l'Ouémé (Benin, Afrique de l'ouest). *Journal of Applied Biosciences*, 154(1), 15913-15925. <https://doi.org/10.35759/JABs.154.8>

Mikoda, B., Gruszecka-Kosowska, A., Klimek, A., & Tomczyk, A. (2018). Air pollution control and flue gas desulfurization residues from Polish copper smelting facility as adsorbents of Pb (II) and Cu (II) from aqueous solutions. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(31), 31520-31534. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3133-5>

Mohapatra, R. K., Parhi, P. K., Thatoi, H., & Panda, C. R. (2017). Bioreduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium indicum* strain MW1 isolated from marine water of Paradip Port, Odisha, India. *Chemistry and Ecology*, 33(2), 114-130. <https://doi.org/10.1080/02757540.2016.1275586>

Mostefaoui, A., Hakem, A., Yabrir, B., Boutaiba, S., & Badis, A. (2014). Screening for exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 8(22), 2208-2214. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.6759>

Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T. T., Boudou, A., Coste, M., & Delmas, F. (2007). Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Fundamental and Applied Limnology*, 168(2), 179-187. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2007/0168-0179>

Mrvčić, J., Butorac, A., Šolić, E., Stanzer, D., Bačun-Družina, V., Cindrić, M., & Stehlik-Tomas, V. (2013). Characterization of *Lactobacillus brevis* L62 strain, highly tolerant to copper ions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 75-85. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1160-9>

Mrvčić, J., Stanzer, D., Bačun-Družina, V., & Stehlik-Tomas, V. (2009). Copper binding by lactic acid bacteria (LAB). *Bioscience and Microflora*, 28(1), 1-6. <https://doi.org/10.12938/bifidus.28.1>

Mustapha, M. U., & Halimoon, N. (2015). Screening and isolation of heavy metal tolerant bacteria in industrial effluent. *Procedia Environmental Sciences*, 30(1), 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.10.006>

N

Nair, A., Juwarkar, A. A., & Singh, S. K. (2007). Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 180(1), 199-212. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9263-2>

N'tcha, C., Haziz, S., Agbobatinkpo, P., Vieira-Dalodé, G., Boya, B., et al, (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from a beninese traditional beer's ferment, *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 7(2). 314-330.

O

Ochoa-González, R., Cuesta, A. F., Córdoba, P., Díaz-Somoano, M., Font, O., López-Antón, M. A., ... & Giménez, A. (2011). Study of boron behaviour in two Spanish coal combustion power plants. *Journal of Environmental Management*, 92(10), 2586-2589. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.05.028>

Ogbonna, C. E., Adinna, E. N., Ugbo, O. C., & Otitoju, O. (2013). Heavy metal concentration and Physicochemical properties of soil in the lead-zinc mining area of Ishiagu, Nigeria. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 3(10), 61-69.

Olson, P. E., Castro, A., Joern, M., DuTeau, N. M., Pilon-Smits, E., & Reardon, K. F. (2008). Effects of Agronomic Practices on Phytoremediation of an Aged PAH-Contaminated Soil. *Journal of Environmental Quality*, 37(4), 1439-1446. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0202>

Oorts, K., Ghesquiere, U., Swinnen, K., & Smolders, E. (2006). Soil properties affecting the toxicity of CuCl₂ and NiCl₂ for soil microbial processes in freshly spiked soils. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(3), 836-844. <https://doi.org/10.1897/04-672R.1>

Oves, M., Saghir Khan, M., Huda Qari, A., Nadeen Felemban, M., & Almeelbi, T. (2016). Heavy metals: biological importance and detoxification strategies. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 7(2), 1-15. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000312>

P

Pandit, R. J., Patel, B., Kunjadia, P. D., & Nagee, A. (2013). Isolation, characterization and molecular identification of heavy metal resistant bacteria from industrial effluents, Amala-khadi-Ankleshwar, Gujarat. *International Journal of Environmental Sciences*, 3(5), 1689.

Peng, K., Luo, C., Lou, L., Li, X., & Shen, Z. (2008). Bioaccumulation of heavy metals by the aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton malaianus* Miq. and their potential use for contamination indicators and in wastewater treatment. *Science of the total environment*, 392(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.11.032>

R

Real, M. I. H., Azam, H. M., & Majed, N. (2017). Consumption of heavy metal contaminated foods and associated risks in Bangladesh. *Environmental monitoring and assessment*, 189(12), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6362-z>

Rodríguez, L. M., & Alatossava, T. (2008). Effects of copper supplement on growth and viability of strains used as starters and adjunct cultures for Emmental cheese manufacture. *Journal of applied microbiology*, 105(4), 1098-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03849.x>

S

Sandes, S., Alvim, L., Silva, B., Acurcio, L., Santos, C., Campos, M., ... & Nunes, Á. (2017). Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: Looking for immunobiotics through in vitro and in vivo approaches for

- immunoprophylaxis applications. *Microbiological Research*, 200(1), 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.008>
- Sarret, G., Avoscan, L., Carrière, M., Collins, R., Geoffroy, N., Carrot, F., ... & Gouget, B. (2005). Chemical forms of selenium in the metal-resistant bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 exposed to selenite and selenate. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2331-2337. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2331-2337.2005>
- Savadogo, A., Ouattara, C. A., Savadogo, P. W., Barro, N., Ouattara, A. S., & Traoré, A. S. (2004). Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*, 3(3), 189-194. DOI : [10.5897/AJB2004.000-2034](https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2034)
- Schut, S., Zauner, S., Hampel, G., König, H., & Claus, H. (2011). Biosorption of copper by wine-relevant *Lactobacilli*. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.039>
- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Chaiyaso, T., Hanmoungjai, P., Leksawasdi, N., & Techapun, C. (2014). Enhancement and optimization of exopolysaccharide production by *Weissella confusa* TISTR 1498 in pH controlled submerged fermentation under high salinity stress. *Chiang Mai Journal of Science*, 41(1), 503-512.
- Seghairi, N., Mimeche, L., Debabeche, M., & Hamzaoui, A. (2013). Elimination du cuivre présent dans les eaux usées industrielles sur un filtre planté de Tamarix. *Courrier du Savoir*, 15(1), 53-57.
- Serbula, S. M., Ilic, A. A., Kalinovic, J. V., Kalinovic, T. S., & Petrovic, N. B. (2014). Assessment of air pollution originating from copper smelter in Bor (Serbia). *Environmental Earth Sciences*, 71(4), 1651-1661. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2569-7>
- Sizentsov, A. N., Kvan, O. V., Miroshnikova, E. P., Gavrish, I. A., Serdaeva, V. A., & Bykov, A. V. (2018). Assessment of biotoxicity of Cu nanoparticles with respect to probiotic strains of microorganisms and representatives of the normal flora of the intestine of broiler chickens. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(16), 15765-15773. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1761-4>
- Sobha, K., Poornima, A., Harini, P., & Veeraiah, K. (2007). A study on biochemical changes in the fresh water fish, *Catla catla* (Hamilton) exposed to the heavy metal toxicant cadmium

chloride. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 3(2), 1-11. <https://doi.org/10.3126/kuset.v3i2.2890>

Soliman, Z. I. (2006). A study of heavy metals pollution in some aquatic organisms in Suez Canal in Port-Said Harbour. *Journal of Applied Sciences Research*, 2(10), 657-663.

Soro, G., Métongo, B., Soro, N., Ahoussi, E., Kouamé, F., Zade, S., & Soro, T. (2009). Métaux lourds (Cu, Cr, Mn et Zn) dans les sédiments de surface d'une lagune tropicale africaine : cas de la lagune Ebrie (Côte d'Ivoire). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(6).

DOI: [10.4314/ijbcs.v3i6.53161](https://doi.org/10.4314/ijbcs.v3i6.53161)

Surayot, U., Wang, J., Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Tabarsa, M., Lee, Y., & You, S. (2014). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structural analysis, molecular weight effect on immunomodulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68(1), 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.005>

T

Tallon, R., Bressollier, P., & Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705-712. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.006>

Tang, X., Shen, C., Shi, D., Cheema, S. A... & Khan, M. I. (2010). Heavy metal and persistent organic compound contamination in soil from Wenling : an emerging e-waste recycling city in Taizhou area, China. *Journal of Hazardous Materials*, 173(1), 653-660. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2009.08.134](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.134)

Tian, F., Xiao, Y., Li, X., Zhai, Q., Wang, G., Zhang, Q., ... & Chen, W. (2015). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8246 against copper toxicity in mice. *Public Library of Science one*, 10(11), e0143318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143318>

Tumin, N. D., Chuah, A. L., Zawani, Z., & Rashid, S. A. (2008). Adsorption of copper from aqueous solution by *Elais Guineensis* kernel activated carbon. *Journal of Engineering Science and Technology*, 3(2), 180-189.

Turabelidze, G., Schootman, M., Zhu, B. P., Malone, J. L., Horowitz, S., Weidinger, J., ... & Simoes, E. (2008). Multiple sclerosis prevalence and possible lead exposure. *Journal of the Neurological Sciences*, 269(1-2), 158-162. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.01.008>

U

Usman, A. R., Lee, S. S., Awad, Y. M., Lim, K. J., Yang, J. E., & Ok, Y. S. (2012). Soil pollution assessment and identification of hyperaccumulating plants in chromated copper arsenate (CCA) contaminated sites, Korea. *Chemosphere*, 87(8), 872-878. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.028>

W

Wang, X., Zang, S., (2014). Distribution characteristics and ecological risk assessment of toxic heavy metals and metalloid in surface water of lakes in Daqing Heilongjiang Province, China. *Ecotoxicology*, 23(1), 609–617. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1177-y>

Wei, C., Wang, C., Yang, L. (2009). Characterizing spatial distribution and sources of heavy metals in the soils from mining-smelting activities in Shuikoushan, Hunan Province, China. *Journal of Environmental Sciences*, 21(9), 1230-1236. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62409-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62409-2)

Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., & Tang, M. (2009). Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1), 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.040>

Woo, S., Yum, S., Park, H. S., Lee, T. K., & Ryu, J. C. (2009). Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(3), 289-299. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.002>

X

Xu, R., Ma, S., Wang, Y., Liu, L., & Li, P. (2010). Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *African Journal of Microbiology Research*, 4(9), 783-795. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000644>

Xu, X., Zhao, Y., Zhao, X., Wang, Y., & Deng, W. (2014). Sources of heavy metal pollution in agricultural soils of a rapidly industrializing area in the Yangtze Delta of China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108(1), 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.001>

Y

Yao, H., Xu, J., & Huang, C. (2003). Substrate utilization pattern, biomass and activity of microbial communities in a sequence of heavy metal-polluted paddy soils. *Geoderma*, 115(1-2), 139-148. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(03\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(03)00083-1)

Youcef, L., & Achour, S. (2005). Elimination des phosphates par des procédés physico-chimiques. *Larhys Journal*, 4(1), 129-140.

Youcef, L., & Achour, S. (2006). Elimination du cuivre par des procédés de précipitation chimique et d'adsorption. *Courrier du Savoir*, 7(1), 59-65.

Z

Zantar, S., El Galiou, O., Zerrouk, H. M., & Laglaoui, A. (2013). Elaboration d'un fromage de chèvre semi-affiné à partir d'une sélection de souches lactiques autochtones isolées du lait de chèvres du Nord du Maroc. *Options Méditerranéennes A*, 108(1),191-197.

Zeng, J., & Han, G. (2020). Preliminary copper isotope study on particulate matter in Zhujiang River, south west China : Application for source identification. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198(1), 110663. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110663>

Zeybek, Z., & Dursun, S. (2021). Investigation of Copper removal mechanisms on *Quercus robur* acorn caps: Equilibrium, kinetics, thermodynamic and characterization studies. *Applied Water Science*, 11(6), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13201-021-01434-0>

Zhai, Q., Yin, R., Yu, L., Wang, G., Tian, F., Yu, R., & Chen, W. (2015). Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. *Food Control*, 54(1), 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.037>

Annexes

Annexe 01 :**De Man-Rogosa Sharp (MRS bouillon et agar)**

Peptone.....	10g
Extrait de levure.....	04g
Extrait de viande.....	08g
Glucose.....	20g
Phosphate Dipotassique	02g
Acétate de sodium.....	05g
Citrate d'ammonium.....	02g
Sulfate de manganèse	0.05g
Sulfate de magnésium	0.2g
Tween 80.....	1ml
Agar	15g
Eau distillée.....	1L

pH = 6.2 Autoclavage 120°C/ 20 min.

❖ Préparation des milieux

Gélose MRS : Préparation de la gélose MRS : dissoudre 68.3g de gélose MRS déshydraté dans 1L d'eau distillée et ajouté 1ml de Tween 80%. L'ajustement de pH (6±2). Autoclavage 120°C/ 20min.

Bouillon MRS : Préparation de la bouillon MRS : dissoudre 52.12g de milieu MRS déshydraté dans 1L d'eau distillée. L'ajustement de pH (6±2). Autoclavage 120°C/ 20min

Annexe 02 : La solution mère de cuivre :

Préparation de la solution mère du cuivre : Masse molaire du (CuSO₄) = 159.609g/mol Masse molaire du (Cu) = 63.546 U. La solution mère de cuivre a été préparée (1000 mg/l) par la dissolution de 2,511 g de Cu so₄, dans de l'eau distillée (1L) et autoclavée. La solution mère a été diluée pour obtenir la concentration désirée (30 mg/l).

Annexe 03 : Protocole de coloration de Gram

1. Verser sur une lame une goutte d'eau physiologique et mélanger avec une colonie de l'échantillon puis fixer à la chaleur.
2. Couvrir le frottis avec le violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute. Rincer la lame avec l'eau de robinet.
1. Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée- Recouvrir avec de Lugol pendant 30 secondes

2. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
3. Rincer immédiatement le frottis avec l'alcool en inclinant la lame et par goutte à goutte.
4. Laver à l'eau distillée jusqu'à disparition de la couleur violette.
5. Couvrir la lame avec la fuschine pendant 1 minute.
6. Rincer doucement avec l'eau distillée et sécher avec du papier absorbant.
7. Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope optique à un fort grossissement (G x 100).

Annexe 04 :**Gélose hypersaccharosée**

Peptone.....	2.5g
Extrait de levure.....	03 g
Extrait de viande.....	10g
Saccharose.....	150g
Phosphate Dipotassique	02g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
NaCl	01g
Agar	15g
Eau distillée.....	1L

pH = 6.8 Autoclavage 120°C/ 20 min.

Annexe 05 :**Bouillon MRS modifié**

Peptone.....	10g
Extrait de levure.....	04g
Extrait de viande.....	08g
Lactose	20g
Phosphate Dipotassique	02g
Acétate de sodium.....	05g
Citrate d'ammonium.....	02g
Sulfate de manganèse	0.05g
Sulfate de magnésium	0.2g
Tween 80.....	1ml
Eau distillée.....	1L

pH = 6.2 Autoclavage 120°C/ 20 min.

Annexe 06 :

Solution de TCA 80% : 8g de cristaux dissoudre dans 10ml d'eau distillée. Agitation vigoureuse par le vortex.

Annexe 07 :

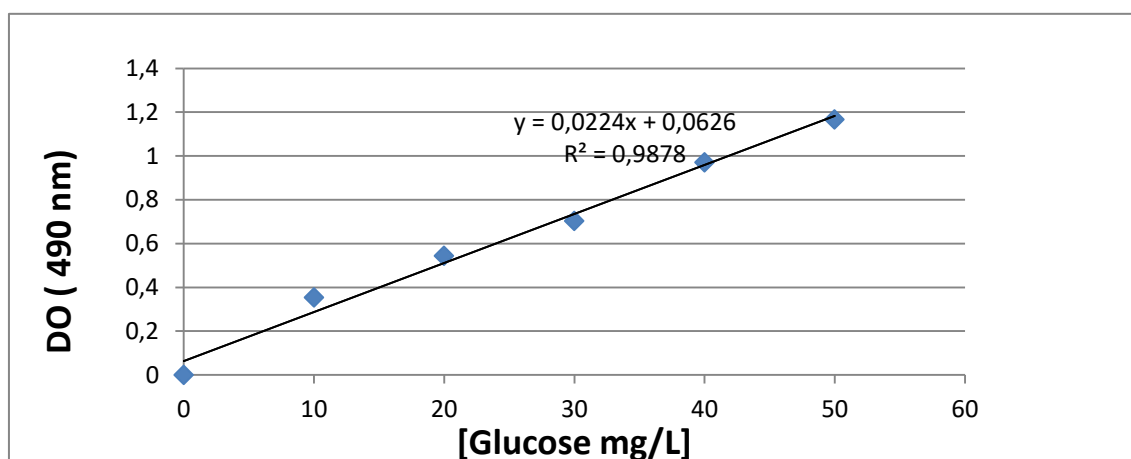
Solution de phénol 6 % :

3g de cristaux de phénol dissoudre dans 50 ml d'eau distillée et mélanger doucement.

Annexe 08 : La densité optique (600 nm) des onze souches en présence et en absence de Cu^{+2} .

Temps		T_{0h}	T_{24h}	T_{48h}	T_{72h}	T_{96h}
Souches						
L21	Sans Cu^{+2}	0,0084	0,0526	0,5924	1,115	/
	Avec Cu^{+2}	0,0338	0,0724	0,8074	1,1911	/
L23	Sans Cu^{+2}	0,0312	0,1299	0,825	0,887	0,8578
	Avec Cu^{+2}	0,06301	0,1037	1,0198	1,0407	1,0052
L30	Sans Cu^{+2}	0,0087	0,3827	1,0727	1,0855	/
	Avec Cu^{+2}	0,0227	0,2709	1,1572	1,2009	/
L S2	Sans Cu^{+2}	-0,0683	0,9648	1,0288	1,0293	/
	Avec Cu^{+2}	-0,056	0,978	1,0398	1,0406	/
ANS3	Sans Cu^{+2}	0,0385	0,9846	0,9983	0,9916	0,9665
	Avec Cu^{+2}	0,0475	1,0865	1,1078	1,1107	1,1012
LGS1	Sans Cu^{+2}	-0,0424	1,103	1,1592	1,1922	1,1996
	Avec Cu^{+2}	-0,0313	1,0892	1,1526	1,1761	1,173
Lb41	Sans Cu^{+2}	-0,0125	1,0429	1,1177	1,1815	/
	Avec Cu^{+2}	0,0118	0,9471	1,0787	1,1389	/
N5	Sans Cu^{+2}	-0,0661	0,9469	1,0421	1,0501	/
	Avec Cu^{+2}	-0,04	1,0081	1,0558	1,0578	/
R15	Sans Cu^{+2}	-0,0335	0,7333	1,0544	1,1289	/
	Avec Cu^{+2}	-0,0137	0,7081	1,0875	1,1536	/
R16	Sans Cu^{+2}	0,0186	0,0859	0,4793	0,5728	/
	Avec Cu^{+2}	0,0363	0,0920	0,8395	1,1996	/
R22	Sans Cu^{+2}	-0,0594	0,0163	1,0289	1,0114	0,9980
	Avec Cu^{+2}	0,0065	0,0261	0,0897	1,0428	1,022

Annexe09 : Courbe d'étalonnage de glucose.

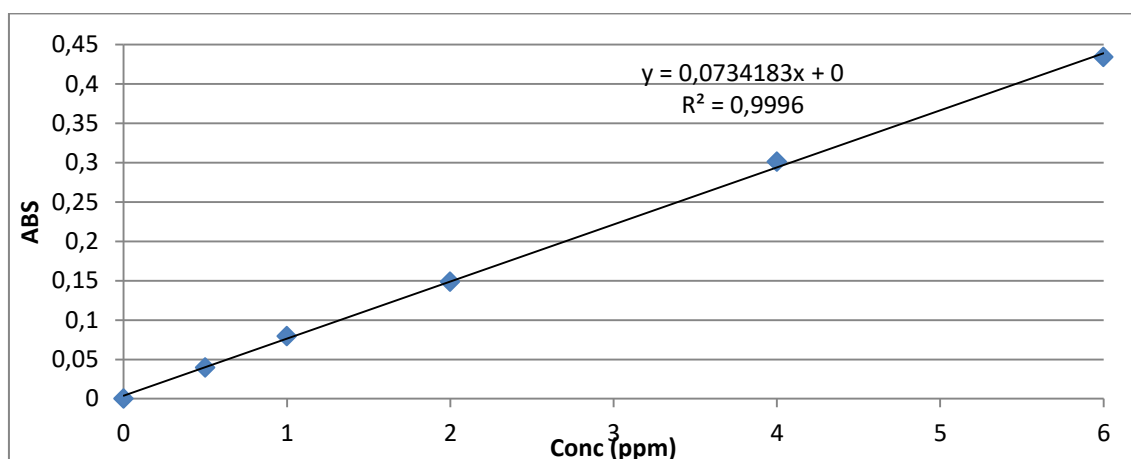


Les valeurs obtenues après substitution dans l'équation graphique sont multipliées par 2 lors de l'utilisation de 250 μ l de la solution d'EPS au lieu de 500 μ l.

Annexe 10 : La DO et la quantité des exopolysaccharides produites par les trois souches lactiques sélectionnés.

Souche	DO (490nm)	[EPS] mg/l
LGS1	1,2909	55.859
Lb41	1.4770	64.318
R15	2.0416	89.981

Annexe 11 : courbe d'étalonnage de cuivre résiduel par le SAA :



$$\text{Abs} = 0.0734183 \text{ Conc} + 0$$

Concentration (ppm)	Absorbance
0.5000	0.0394
1.0000	0.0793
2.0000	0.1485
4.0000	0.3011
6.0000	0.4338

Annexe 12 : Mesure de la DO et de la concentration de cuivre.

Souche	DO (600nm)				[Cu ⁺²] 50mg/l			
	T ₀	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}	T ₀	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}
LGS1	0.0155	1.0119	0.9727	1.0459	50,43	58,6	65,4	70,8
Lb41	0.0398	0.9641	1.0077	1.0185	50,43	81,7	64	50,4
R15	0.0252	0.9986	0.9865	1.0340	50,43	68,1	77,6	80,4

Président : Dr. Laib Essaid	Présenté par :
Encadreur : Pr. Ouled Haddar Houria	M^{elle} : Boulouf Yousra
Examinatrice : Dr. Amira Samiya	M^{elle} : Zeghouani Cheyma

Isolement de quelques bactéries lactiques tolérantes au cuivre à partir du lait et dérivés pour une éventuelle application en bioremédiation

Résumé

Le cuivre se trouve dans l'environnement à des niveaux très élevés à cause de sa grande utilisation par différentes industries, il est l'un des métaux lourds les plus hautement toxiques puisqu'il persiste et il affecte tous les systèmes biologiques. Cette étude vise à isoler et à identifier des BL du lait et dérivées et d'évaluer leur tolérance au cuivre dans le bouillon MRS. Onze souches de BL ont été isolées et affiliées aux genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Enterococcus*. Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches résistent au cuivre à 30 mg/l. Nous avons sélectionné trois souches, *Leuconostoc sp* (R15 et Lb41) et *Enterococcus sp* (LGS1) en fonction de leur taux de croissance afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice, ces souches sont capables de tolérer la présence du cuivre dans le milieu avec une concentration minimale inhibitrice de 150 mg/l. La quantification des EPS montre que la souche *Leuconostoc Sp*. (R15) est capable de produire 89.981 mg/l d'exopolysaccharides. La capacité de ces bactéries lactiques à résister au cuivre peut être exploitée dans le domaine de bioremédiation des métaux lourds.

Mots clés : Bactéries lactiques, cuivre, tolérance, exopolysaccharides, bioremédiation.

Abstract

Copper is found in the environment at very high levels because of its wide use by different industries, it is one of the most highly toxic heavy metals as it persists and affects all biological systems. This study aims to isolate and to identify some lactic acid bacteria (LAB) from milk and dairy products and to evaluate their tolerance to copper in MRS broth. Eleven LAB strains were isolated and affiliated to the *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Enterococcus* genera. The results obtained showed that all strains were resistant to copper at 30 mg/l. We have selected three strains of *Leuconostoc sp*. (R15 and Lb41) and *Enterococcus sp*. (LGS1) depending on their growth rate to determine the minimum inhibitory concentration. These strains were able to tolerate the presence of copper in the medium with a minimum inhibitory concentration of 150 mg/l. The quantification of exopolysaccharides showed that the strain *Leuconostoc sp*. (R15) is able to produce 89.981 mg/l of EPS. The ability of these lactic acid bacteria to resist copper could be exploited in the field of heavy metal bioremediation.

Key words: Lactic acid bacteria, copper, tolerance, exopolysaccharides, bioremediation.

المخلص

يتواجد النحاس في البيئة بمستويات عالية جدا نظراً لاستخدامه المكثف من قبل الصناعات المختلفة ويعد من أكثر المعادن الثقيلة عالية السمية بسبب عدم تحلله، وتأثيره على جميع الأنظمة البيولوجية. تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص البكتيريا اللبنية من الحليب ومشتقاته وتقييم مدى مقاومتها للنحاس في مرق MRS. تم الحصول على إحدى عشر عزلة بكتيرية وتبين أنها تنتمي إلى جنس *Leuconostoc* و *Lactobacillus* و *Enterococcus* أظهرت النتائج المتحصل عليها أن جميع السلالات مقاومة للنحاس بمقدار 30 مغ/ل. تم انتقاء ثلاث سلالات *Leuconostoc sp*. (R15 et Lb41) و *Enterococcus sp*. (LGS1) اعتماداً على معدل نموها لتحديد التركيز الأدنى المثبط. هذه السلالات أثبتت أنها قادرة على تحمل وجود النحاس في الوسط بتركيز مثبط أدنى مقداره 150 مغ/ل. أظهر التقدير الكمي لمتعدد السكر الخارجي أن *Leuconostoc sp*. (R15) قادرة على إنتاج 89.981 مغ/ل. لهذا يمكن استغلال البكتيريا اللبنية المقاومة للنحاس في مجال المعالجة الحيوية للمعادن الثقيلة. الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللبن، النحاس، المقاومة، متعدد السكر الخارجي، المعالجة الحيوية.