

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد الصديق بن يحيى-جيجل
Université Mohamed Seddik Benyahia -Jijel

culté des Sciences de la Nature et de la Vie
partement des Sciences de l'Environnement
Sciences Agronomiques.



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم علوم المحيط و العلوم الزراعية

Mémoire

Présenté Par :

M^{elle} : Abbas Nadjiba

En vue de l'obtention du diplôme

Magister

Filière : Biologie

Spécialité : Environnement et Santé

Thème

*Evaluation de la capacité de quelques bactéries lactiques
de la région de Jijel à accumuler quelques
éléments traces métalliques*

Membres de Jury:

- | | | |
|---|-------------------------|---------------------|
| ❖ Président : Mr. Lahouel Mesbah | Professeur | Université de Jijel |
| ❖ Examineurs: Mr. Leghouchi Essaid | Professeur | Université de Jijel |
| Mr. Idoui Tayeb | Professeur | Université de Jijel |
| ❖ Encadreur : M ^{me} Ouled Haddar Houria | Maitre de Conférences A | Université de Jijel |

Numéro d'ordre: /....

Session: 2016 /2017

REMERCIEMENTS

Tous mes remerciements vont tout premièrement à Allah tout Puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné pour terminer ce mémoire.

Un immense respect et merci à M^{me} Houria Ouled Haddar qui a encadré mon mémoire, pour sa disponibilité infaillible à mon égard, ses aides inappréciables, connaissances, sa compétence, sa rigueur scientifique et son soutien moral. Qu'elle en soit grandement remerciée.

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce modeste travail :

Professeur Mesbah Lahouel, d'avoir bien voulu présidé mon jury de soutenance et d'être intéressé à mon travail, et j'exprime une profonde reconnaissance aux Professeurs Essaid Leghouchi et Tayeb Idoui pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de lui porter un éclairage différent.

J'exprime mes sincères remerciements à l'ensemble du personnel du :

⌘ Laboratoire de Toxicologie Moléculaire ⌘ où j'ai réalisé ce mémoire « Mr. Yahya, Noujoud, Nadia et Wahiba et surtout Karima, Salima, Hamida, Hadjar, Nessrine et Ilhem ».

⌘ Laboratoire de Phytochimie ⌘ « Karima, Meriem, Hadya, Samira, Safia Habila » et Nassima Belli.

Je tiens aussi à exprimer mon profond remerciement à l'ensemble des Ingénieurs du Laboratoire de Microbiologie sans oublier M^{me} la responsable des laboratoires pour leur aide durant la période de réalisation de ce travail.

Enfin,

je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont apporté leur contribution à ce travail.

Je leur exprime ici toutes mes reconnaissances et ma sympathie.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail, ce fruit de longue haleine
tout d'abord :

À la bougie qui a éclairé mon chemin depuis ma naissance,
à celle dont j'ai prononcé le premier mot, source de ma vie ma « Mère ».

À mon « Père », pour son soutien moral et financier, son courage
et son dévouement, que je n'oublierai jamais.

À mes frères, Rabah, Nadjib, Adel, Moussa, et surtout mon suprême
Proverbial, grand frère « Mohamed Fauzi ».

À ma sœur Loubna et sa fille Sara, Madiha et leurs enfants Yahya, Adem, Malak
et un grand bisous pour la petite Roaya

À toute la famille Abbas et Ayad, sans oublier ma chère
amie Zineb qui est toujours présente avec ses conseils, ses sacrifices
pendant tout mon cycle d'étude.

À mes collègues de notre spécialité Environnement et Santé
promotion « 2016/2017 »

Enfin, à tous ceux que j'aime

NADJIBA

Liste des figures	IV
Liste des tableaux	VI
Liste des abréviations	VII
Introduction.....	01

Revue bibliographique

I. Les métaux lourds

I.1 Généralités sur les métaux lourds	03
I. 2 Caractéristiques générales des métaux lourds	04
I.3. Propriétés physico-chimiques des ETM	04
I .4. Sources des métaux lourds dans l'environnement.....	05
I .5. Pollution par les Métaux lourds	06
I .5.1. Effets des métaux lourds sur l'environnement.....	07
I .5.1.1. Effets des métaux lourds sur la vie aquatique.....	07
I .5.1.2. Effets des métaux lourds dans le sol.....	08
I .5.1.3. Contamination de l'air par les métaux lourds	08
I .5.2. Effets des métaux lourds sur la santé humaine	09

II. Les bactéries lactiques

II.1. Principales caractéristiques des bactéries lactiques	11
II .2. Les différents genres de bactéries lactiques	11
II.3. Les bactéries lactiques comme probiotiques.....	12
II.3.1. Critères de sélection des BL comme probiotique.....	12
II.3.2. Importance et avantages des BL probiotiques.....	13
II .3.3. Place des BL dans le microbiote intestinal	13

III. Interactions bactéries lactiques-métaux lourds

III. 1. Introduction	16
III.2. Rôle des BL dans la détoxification des métaux lourds.....	18
III. 3. Les conditions d'efficacité des BL dans la désintoxication des métaux lourds.....	20
III. 4. Rôle des BL dans la détoxification du chrome.....	20
III. 4.1. Généralités sur le chrome.....	20
III. 4.2. Effet du chrome sur la santé humaine.....	21
III. 4.3. Interactions microbienne avec le Cr (VI).....	22

Matériel et Méthodes

I. Matériel	24
I.1. Les souches bactériennes	24
I.2. Milieux de culture	25
I.3. Produits chimiques	25
II. Méthodes.....	25
II.1. Revivification des souches.....	25
II.2. Préparation des solutions mères de métaux lourds.....	26
II.3. Purification et repiquage des bactéries lactiques d'origine locale.....	26
II.4. Réalisation d'une courbe d'étalonnage pour la quantification des cellules par spectro- photométrie.....	27
II.4.1. Calcul du taux de croissance bactérienne.....	27
II.5. Screening des bactéries lactiques ayant la capacité de croître en présence des métaux lourds.....	27
II.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	28
II.7. Etude de la cinétique de croissance de la BL sélectionnée (St.sa) en présence du chrome.....	28
II.8. Etude des interactions du chrome avec la souche (St.sa)	29
II.8.1. Méthode colorimétrique de dosage du chrome.....	29
a- Préparation de la solution acide de diphénylcarbazine (DPC).....	29
b- Etablissement de la courbe d'étalonnage du chrome.....	30
c- Mode opératoire	30
II.8.2. Le taux de réduction du chrome	30
II.8.3. Lyse des cellules bactériennes.....	30
II.8.4. Détermination du poids sec de la biomasse.....	31
II.9. Evaluation biologique des aptitudes probiotiques <i>in vitro</i>	31
II.9.1. Tolérance aux acides.....	31
II.9.2. Tolérance aux sels biliaires.....	32
a- Préparation du bouillon MRSO (1 L).....	32
b- Protocole expérimental	32
II.9.3. Pouvoir antagoniste des bactéries lactiques.....	32

Résultats et Discussion

I.1. Criblage des souches résistantes aux métaux.....	34
I.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :.....	38
I.3. Influence de Chrome sur la croissance de la souche St.sa.....	41
I.4. Etude des interactions du chrome avec la souche St.sa.....	43
I.4.1. variations de chrome (VI) extracellulaire dans le milieu de culture	43
I.4.2. Bioaccumulation du chrome (VI) par la culture bactérienne	47
I.5. Evaluation des aptitudes probiotiques de la BL <i>in vitro</i>	48
I.5.1 Evaluation du taux de survie de la BL aux conditions acides.....	48
I.5.2. Evaluation du taux de survie de la BL aux sels biliaires.....	51
I.5.3. Aptitude antagoniste de <i>S. salivarius</i> <i>spp</i> <i>thermophilus</i>	53
Conclusion	55
Références bibliographiques	57
Annexes	VIII
Résumé	

Liste des figures

Figure 1 :	Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques basé sur la comparaison du gène de l'ARN16S.....	11
Figure 2 :	Composition de la microflore intestinale humaine.....	15
Figure 3 :	Interaction entre les métaux lourds et les surfaces bactériennes.....	17
Figure 4 :	Mécanismes d'interaction micro-organismes-métaux lourds.....	18
Figure 5 :	Application des BL dans les processus d'élimination des ions métalliques dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire.....	19
Figure 6 :	La réduction de l'anion chromate par les réductases ascorbate (AsA) et glutathione (GSH) en intermédiaires éphémères Cr(V) et/ou Cr(IV), radicaux libres et le produit final est le Cr(III) dans les cellules.....	22
Figure 7 :	Cinétique de croissance de la souche 45 dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	34
Figure 8 :	Cinétique de croissance de la souche St.sadans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	34
Figure 9 :	Cinétique de croissance de la souche Lb.deldans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	35
Figure 10 :	Cinétique de croissance de la souche T5dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	35
Figure 11 :	Cinétique de croissance de la souche Lb.condans le bouillon MRS en présnce de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	35
Figure 12 :	Cinétique de croissance de la souche 15dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	35
Figure 13 :	Cintique de croissance de la souche CHT24dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	36
Figure 14 :	Cinétique de croissance de la souche Bj432dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	36
Figure 15 :	Cinétique de croissance des dix souches dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	36
Figure 16 :	Cinétique de croissance de la souche G1dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48 h.....	36

Figure 17 :	Cinétique de croissance de <i>St.sa</i> en présence de différentes concentrations en Cr (VI) dans le bouillon MRS à 37°C.....	42
Figure 18 :	Valeurs de la moyenne (\pm SE) de l'évolution de la concentration du Cr (VI) mg/l et la cinétique de croissance de <i>St.sa</i> dans le bouillon MRS en fonction du temps et en présence d'une concentration initiale en Cr de 50 mg/L.....	44
Figure 19 :	Valeurs de la moyenne (\pm SE) de la variation du pourcentage d'élimination du Cr (VI) en fonction du temps par la souche <i>St.sa</i>	46
Figure 20 :	Valeurs de la moyenne (\pm SE) de la bioaccumulation du Cr par <i>St.sa</i> en présence de 50 mg/l dans le bouillon MRS après 72h d'incubation à 37°C....	47
Figure 21 :	Croissance de la souche <i>S. salivarius</i> <i>sphtherophilus</i> incubée dans le bouillon MRS additionné de sels biliaires.....	52

Liste des tableaux

Tableau 1 :	La classification des éléments du tableau périodique selon Baize, 1997.....	03
Tableau 2 :	Les sources anthropiques des métaux lourds spécifiques dans l'environnement.....	06
Tableau 3 :	Effets nocifs des métaux lourds spécifiques sur la santé humaine.....	10
Tableau 4 :	Composition et origine des probiotiques dans l'intestin humain.....	13
Tableau 5 :	Les souches de bactéries lactiques utilisées.....	24
Tableau 6 :	Les souches de référence utilisées.....	25
Tableau 7 :	Valeurs de la densité optique (DO) mesuré à 600nm pour les souches « CHT24, 45, 05, St.sa» avec « Hg ».....	38
Tableau 8 :	Valeurs de la densité optique (DO) mesuré à 600nm pour la souche St.sa avec Pb, Fe, Cr.....	40
Tableau 9 :	Croissance de la souche <i>S. salivarius ssp thermophilus</i> en fonction du pH du milieu...	49
Tableau10 :	Taux de survie (%) de la souche <i>S. salivarius ssp thermophilus</i> dans le milieu acide...	50
Tableau11 :	Retardement de la croissance de la souche <i>S. salivarius ssp thermophilus</i> incubée dans le bouillon MRS additionné de sels biliaires	53
Tableau12:	Pouvoir antagoniste de la souche <i>S. salivarius ssp thermophilus</i> envers quelques souches pathogènes	54

Liste des abréviations

AsA	Ascorbate
BL	Bactéries Lactiques
CEAEQ	Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec
ChrA	Gène de résistance au chrome
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
Cr(III)	Chrome trivalent
Cr(VI)	Chrome hexavalent
DO	Densité Optique
DPC	Diphénylcarbazine
EPS	Exopolysaccharides
ETM	Eléments Traces Métalliques
GSH	Glutathione
MCL	Niveau maximal du contaminant
[Me]	Concentration de métal
MRS	Man, Rogosa et Sharpennutritive
MTs	Métallothionein
ppm	Partie Par Million
rpm	Rotation per minute
SE	Ecartype
SM	Solution Mere
TGI	Tractus Gastro- Intestinal
μ	Taux de croissance
UFC	Unité formant colonie
US-APE	Agence de la Protection de l'Environnement Américaine

Introduction

Introduction

A cause de l'accroissement du développement économique, l'environnement est en situation critique face au problème de la pollution notamment par les métaux lourds issus des émissions des différents secteurs industriels. L'émission de ces rejets contaminés par les métaux lourds dans le milieu récepteur sans traitement préalable est à l'origine d'un sérieux problème qui présente des risques qui incitent à une préoccupation prioritaire qu'il s'agisse de risques aigus ou de risques chroniques non seulement pour l'environnement mais aussi pour la santé de l'Homme à cause de leur nature non biodégradable et donc leur capacité de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire (**Deng et Wang, 2012**). Par ailleurs, le mercure et le plomb font partie des trois métaux classés comme polluants prioritaires de l'eau par la Communauté Economique Européenne (CEE) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Une attention toute particulière est actuellement portée à la contamination des écosystèmes par ces deux métaux. En cela, ces deux métaux représentent des excellents modèles pour l'étude de l'incidence des autres métaux sur la santé et l'environnement, en plus de leurs niveaux de toxicité élevés qui peuvent induire des problèmes pathologiques variés (**Bhakta et al, 2012**). Face à ce type de problèmes, rencontrés dans le monde entier, il n'existe pas une solution efficace, mais plutôt un ensemble de mesures à mettre en œuvre conjointement. Parmi ces mesures est le traitement de la contamination de l'environnement cause à l'aide des organismes biologiques tels que les plantes et les micro-organismes, ce type de traitement est appelé « Bioremédiation » (**Boonyodying et al, 2012**).

Au cours des dernières années, on a assisté à une augmentation spectaculaire de l'intérêt pour les mécanismes de bioremédiation orientés vers la protection de l'environnement et la santé publique notamment aux métaux lourds (**De la Cueva et al, 2016**). Par ailleurs, l'utilisation des microorganismes ayant des effets bénéfiques sur la santé et la croissance des êtres vivants comme les probiotiques attire de plus en plus l'intérêt de la communauté scientifique dans le but d'améliorer la sécurité et la protection de la santé contre les substances toxiques ingérées à travers les produits alimentaires (**Halttunen et al, 2007**). Le microbiote intestinal, représenté par plusieurs centaines d'espèces bactériennes probiotiques différentes, exerce des effets physiologiques divers dont les répercussions pour l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques (**Quévrain, 2014**). De plus, l'expression d'une activité anti-oxydante par les bactéries lactiques probiotiques a également été rapportée ce qui laisse supposer que ces bactéries jouent un rôle important dans la réduction de la toxicité des substances toxiques comme les métaux lourds retrouvés dans l'eau potable ou même dans certains aliments (**Zhai et al, 2015**).

L'objectif de ce travail est principalement porté sur l'étude de l'accumulation de quelques métaux lourds par les bactéries lactiques, dans cette optique nous essaieront de répondre à la problématique suivante : Les bactéries lactiques jouent-elles un rôle possible dans la détoxification de métaux lourds au niveau du tube digestif ou dans les aliments fermentés ?

Ces bactéries lactiques possédant des propriétés probiotiques et provenant de diverses origines seront choisies et sélectionnées après un test de screening pour leur tolérance aux métaux lourds. La détermination de la CMI est également envisagée. Les bactéries montrant une tolérance significative aux métaux lourds feront ensuite l'objet d'une étude cinétique de leur croissance. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu, un dosage des taux des métaux lourds (cas du chrome hexavalent) intracellulaires sera effectué. Seules les bactéries présentant un mécanisme de résistance par accumulation, par réduction enzymatique ou par adsorption contribueront au maintien de l'équilibre de la flore gastro-intestinale aussi bien qu'à la détoxification de ces polluants largement répandus dans les eaux potables et les aliments.



Revue bibliographique

I. Les métaux lourds

I.1. Généralités sur les métaux lourds

Les métaux lourds sont connus depuis longtemps pour leurs risques potentiels sur la santé des sujets exposés, on désigne sous le terme de métaux lourds ceux dont la masse volumique est supérieure à 5 g/cm^3 (Wang *et Chen*, 2006; Bathla *et Jain*, 2016). Néanmoins l'usage courant fait que cette dénomination assez floue implique une notion négative de toxicité. Mais c'est la raison pour laquelle nous parlerons de notion « Eléments Traces Métalliques » ou ETM celle-ci se substitue peu à peu à celle de métaux lourds, qui sont aussi considérés comme oligo-éléments à cause de leur présence en concentrations trace (de l'ordre du ppb allant à moins de 10 ppm) dans plusieurs compartiments de l'environnement (Tchounwou *et al*, 2012). De manière générale, on qualifie d'élément trace tout élément dont la concentration moyenne dans la croûte terrestre est inférieure à 0.1 % (ou 1000 ppm). Alors ceux dont la concentration est supérieure à 0.1 % dans la nature sont considérés comme des « éléments majeurs » (Ramade, 1993; Ali *et al*, 2013).

Néanmoins, certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement lourds (comme le zinc) alors que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (comme l'arsenic) qui est un métalloïde. Ainsi, pour toutes ces raisons, la communauté scientifique préfère utiliser le terme ETM plutôt que métaux lourds (Ali *et al*, 2013).

Selon Baize 1997, les éléments de la table périodique peuvent être classés, en fonction de certaines caractéristiques physiques et chimiques, en métaux et non métaux, à l'exception d'un petit nombre qualifié de métalloïdes (Tableau 1)

Tableau 1. Classification des éléments du tableau périodique selon Baize (1997)

Métaux	Pb, Fe, K, Na, Mo, Cr, Mn, Hg, Ag, Cd, Co, Rb, Li, Sn.....
Non métaux	Rn, C, N, O, F, Ne, Cl, P, Se, Br, Kr, Xe, I, Rn.
Métalloïdes	B, Si, Ge, As, Sb, Po, Te, At.

I.2. Caractéristiques générales des métaux lourds

Les métaux lourds cités dans le domaine de la biosorption sont généralement classés en trois catégories (**Kinoshita et al, 2013**):

Métaux toxiques tels que : Hg, Cd, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn..... etc

Métaux précieux tels que : Pd, Pt, Ag, Au, Ru.....etc

Radionucléides tels que : U, Th, Ra, Am..... etc

En ce qui concerne leur rôle dans les systèmes biologiques, les métaux lourds sont classés comme essentiels et non essentiels :

Métaux lourds essentiels : sont ceux, qui sont nécessaires pour les organismes vivants en quantités infimes pour les fonctions physiologiques et biochimiques vitales. Exemple : Fe, Mn, Cu, Zn et Ni (**Valls et Lorenzo, 2002; Cloutier et al, 2009; Kinoshita et al, 2013**).

Métaux lourds non essentiels : sont ceux qui ne sont pas nécessaires pour les organismes vivants pour toutes fonctions physiologiques et biochimiques. Exemples ; Cd, Pb, As, Hg, et Cr (**Dabonne et al, 2010; Kinoshita et al, 2013**).

Contrairement aux substances organiques, les métaux lourds sont essentiellement non biodégradables et s'accumulent donc dans l'environnement. L'accumulation des métaux lourds dans les sols et les eaux pose un risque pour la santé humaine et l'environnement (**Ali et al, 2013**). Ces éléments s'accumulent dans les tissus de l'organisme vivant « bioaccumulation » et leurs concentrations augmentent lors de leur passage de niveaux trophiques inférieurs aux niveaux trophiques supérieurs, un phénomène connu sous le nom de « bioamplification » (**Guo et al, 2010; Ali et al, 2013**).

I.3. Propriétés physico-chimiques des ETM

I.3.1. La solubilité

La solubilité est la quantité maximale dissoute d'un composé dans l'eau à une température donnée (**Ballerini et al, 1998**). La solubilité d'un métal indique sa tendance à la mobilisation par lessivage ou par ruissellement (**Jumarie et al, 2001**). Les métaux sont plus ou moins mobiles, plus ou moins solubles. Dans l'eau, ils sont présents sous forme d'oxydes ou de sels, selon les métaux d'origine (**Bodek et al, 1988; Pichard, 2003**). D'une manière générale, la plupart des sels sont solubles, et c'est sous cette forme que les métaux contaminent l'environnement aquatique (**Laughlin et al, 1999; Miquel, 2001**).

I.3.2. La stabilité

Contrairement aux contaminants organiques, les métaux sont indéfiniment stables et ne peuvent être dégradés biologiquement ou chimiquement dans l'environnement (**Desbœuf, 2004**). Une des conséquences les plus sérieuses de la persistance des métaux est leur accumulation dans les chaînes alimentaires. Au bout de ces chaînes, les métaux peuvent atteindre des concentrations qui sont supérieures de plusieurs dizaines de puissances à celles trouvées dans l'eau ou dans l'air (**Beliefert et Perraud, 2001**).

I.3.3. La volatilisation

D'une façon générale, les métaux lourds sont considérés peu ou pas volatiles à l'exception du mercure. Les composés volatiles du mercure s'échappent facilement vers l'atmosphère et constituent une source importante de contamination (**Ballerini et al, 1998**).

I.4. Sources des métaux lourds dans l'environnement

La pollution de l'environnement par les métaux lourds est devenue un grave problème dans le monde entier. Les métaux lourds pénètrent dans l'environnement à partir de deux sources principales, source naturelle et celle anthropique (**Garcia et al, 2016**).

I.4.1. Origine naturelle

En effet, la plupart des métaux lourds sont des éléments constitutifs de la croûte terrestre présents au sein des minerais ou concentrés dans le magma granitique. Ils sont aussi très présents dans les sédiments océaniques (**Ali et al, 2013**). Les sources naturelles les plus importantes sont l'altération des minéraux, de l'érosion et l'activité volcanique (**Sauge-Merle et al, 2012**).

I.4.2. Origine anthropique

Du fait de leurs propriétés physico-chimiques intéressantes, les métaux sont très largement utilisés par l'Homme notamment dans les mines, la galvanoplastie, les pesticides et les engrais (phosphates) en agriculture, les rejets industriels, les dépôts atmosphériques, les boues des rejets urbains, les stations d'épuration, les composts d'ordures ménagères... etc (**Oves et al, 2013**). Ultérieurement les déchets contenant des métaux sont directement ou indirectement rejetés dans l'environnement de plus en plus, en particulier dans les pays en voie de développement, ayant apporté une grave pollution de l'environnement (**Tableau 2**) (**Wang et Chen, 2006**).

Tableau 2. Les sources anthropiques des métaux lourds spécifiques dans l'environnement

Contaminant	MCL en mg/l dans l'eau	Sources	Référence
Arsenic	0.01	Combustion de charbon, production de verre et électronique	Xu <i>et al</i> , 2014
Cadmium	0.005	Dépôts naturels, raffineries métalliques piles et peintures, incinération de plastiques et piles, fumée de tabac.	Halttunen <i>et al</i> , 2007 Qing <i>et al</i> , 2007 Zhai <i>et al</i> , 2015
Chrome	0.05- 0.1	Dépôts naturels, galvanoplastie, tannerie, conservation de bois.	Cervantes <i>et al</i> , 2001 Qian <i>et al</i> , 2013 Priya <i>et al</i> , 2013
Cuivre	1.3	Bon conducteur de chaleur et d'électricité, toiture, produits chimiques et matériel du médicales, pigments, alliages.	Bradl, 2005
plomb	0.015	Dépôts naturels, peintures	Halttunen <i>et al</i> , 2007
Mercur	0.002	Composants naturels de la croûte terrestre, raffineries, combustion.	Kampa <i>et Castanas</i> , 2008.
Fer	5	Fer du jet, fer forgé, acier, alliages, construction, transport, fabrication des machines	Bradl, 2005

I.5. Pollution par les Métaux lourds

La pollution métallique peut être due aux différents métaux, comme l'aluminium, l'arsenic, le chrome, le cobalt, le cuivre, le manganèse, le molybdène, le nickel, le zinc... ou encore à des métaux lourds comme le cadmium, le mercure ou le plomb, plus toxiques que les précédents. Cette pollution provient en effet essentiellement des activités humaines, ou naturellement d'une façon presque négligeable (Audry, 2003; Nithya *et al*, 2011; Xu *et al*, 2014).

La pollution par les métaux lourds pose un problème particulier, car les métaux ne sont pas biodégradables et sont considérés comme l'un des polluants les plus persistants dans l'environnement (Audry, 2003; Giuseppe *et al*, 2014). En outre, tout au long de la chaîne alimentaire, certains se concentrent dans les organismes vivants sous forme inorganique ou sous forme organique. Pour certains éléments, comme l'arsenic et le cuivre, la forme inorganique est la plus toxique. Pour d'autres, comme Hg et Pb, les formes organiques sont les plus toxiques (Biney *et al*, 1991; Pophaly *et al*, 2014). Ils peuvent ainsi atteindre des taux très élevés dans certaines espèces consommées par l'homme, comme les poissons. Cette "bioaccumulation" explique leur très forte toxicité (Audry, 2003; Giuseppe *et al*, 2014).

I.5.1. Effets des métaux lourds sur l'environnement

En effet, la présence des métaux lourds dans l'air, le sol et l'eau est connue comme une source de menace croissante pour l'environnement et la santé humaine :

Les principales menaces pour la santé humaine des métaux lourds sont associées à l'exposition au plomb, cadmium, mercure et arsenic. La toxicité des métaux lourds est augmentée en raison de leur temps de séjour très longs, et aussi à cause de leur longue demi-vie biologique (Nithya *et al*, 2011). De plus, plusieurs études ont montré que l'accumulation des métaux lourds dans l'environnement a pour conséquences des effets préoccupants sur l'équilibre des écosystèmes et sur leurs populations (Sheng *et al*, 2008). Notamment, à des concentrations élevées ils provoquent des perturbations environnementales irréversibles que ce soit dans l'eau ou le sol (Nithya *et al*, 2011).

I.5.1.1. Effets des métaux lourds sur la vie aquatique

L'eau est une ressource précieuse notamment avec la demande croissante enregistrée dans le monde entier, mais elle est exposée à de nombreuses sources de pollution (Chatterjee *et al*, 2010).

Un écosystème aquatique devient insalubre ou malsain lorsque l'équilibre de l'état naturel a été perturbé. Ces perturbations peuvent être physiques, biologiques ou chimiques, ces dernières résultent des rejets des ETM et d'autres produits chimiques qui peuvent avoir des effets toxiques aigus ou chroniques sur la vie aquatique et peuvent produire des modifications considérables dans les communautés microbiennes et leurs activités (Hussein *et al*, 2004; Nithya *et al*, 2011). Or, ces effets surviennent seulement lorsque les organismes sont exposés à des niveaux de concentrations supérieurs à ceux qu'ils requièrent normalement (Biney *et al*, 1991; Talab *et al*, 2016).

La contamination par les métaux lourds peut atteindre les eaux de surface et les eaux souterraines par le biais de sources naturelles (lixiviation du minerai, érosion des minéraux avec les sédiments) ou d'activités humaines (engrais chimiques, pesticides, élimination des déchets solides industriels et des déchets domestiques) (Kaimossi *et al*, 2005; Gaur *et al*, 2013). A de faibles concentrations, beaucoup d'ETM, dont Hg, Cd, Pb, As et Cu inhibent la photosynthèse et la croissance du phytoplancton (Biney *et al*, 1991). Les effets observés à des niveaux trophiques supérieurs se manifestent notamment par un retard du développement des embryons, des malformations et une moins bonne croissance des adultes chez les poissons, les mollusques et les crustacés (Biney *et al*, 1991; Talab *et al*, 2016).

I.5.1.2. Effets des métaux lourds dans le sol

La contamination des sols par les métaux lourds est l'un des principaux problèmes environnementaux dans le monde, leur présence peut affecter considérablement les propriétés physico-chimiques du sol ainsi que la communauté microbienne et la réduction des activités environnementales et biologiques telles que la minéralisation de la matière organique (**Sheng et al, 2008; Wei et al, 2009; Gaur et al, 2013**). De nombreuses pratiques agricoles et industrielles ont conduit à la pollution du sol par des ions de métaux lourds, comme les fonderies, les mines, les centrales électriques l'application des pesticides, des engrais et des boues d'épuration contenant des métaux (**Li et al, 2014**). La contamination par les métaux lourds peut avoir des effets importants sur les populations microbiennes indigènes. Par exemple, les métaux lourds peuvent réduire la biodiversité des espèces et limiter la reproduction microbienne, ils sont également impliqués dans la réduction de l'activité microbienne telle que la fixation de l'azote dans le rhizobium (**Wei et al, 2009**).

Chaque métal lourd a une fonction biotique ou biotoxique unique. Par exemple, le cuivre peut améliorer la croissance microbienne à des concentrations faibles, mais supprimer la croissance et perturber la diversité et la physiologie de quelques micro-organismes du sol à des concentrations élevées (**Bitencourt et al, 2016**). En revanche, le cadmium a une toxicité élevée à de faibles concentrations (**Jiang et al, 2008; Wei et al, 2009**). Lorsque les plantes poussent sur un sol pollué par les métaux ils ont tendance à accumuler ces métaux lourds, ce qui affecte leur croissance en plus du risque d'atteindre le consommateur (**Gaur et al, 2013**).

I.5.1.3. Contamination de l'air par les métaux lourds

Les métaux lourds sont transportés dans l'atmosphère sous forme de gaz, d'aérosols et de particules à partir des différentes sources telles que : les poussières minérales, les particules de sel de mer, matières extraterrestres, les aérosols volcaniques et les incendies de forêt (**Leygonie, 1993**), et des sources industrielles telles que les émissions provenant du transport, la combustion du charbon, et de l'émission de particules fugitives (**Bradl, 2005**). Ces éléments métalliques se trouvent à l'état de traces dans des particules atmosphériques, dont les effets biologiques, physiques et chimiques de ces particules sont en fonction de la taille des particules, de leur concentration et de leur composition, le paramètre le plus effectif sur l'environnement étant la taille de ces particules (**Kampa et Castanas, 2008**). Dans l'air ambiant, on trouve de nombreux éléments, comme le plomb, le cadmium, le zinc, le cuivre, etc., dont la concentration est d'autant plus élevée que les particules sont fines (**Ballerini et al, 1998**).

I.5.2. Effets des métaux lourds sur la santé humaine

L'exposition permanente des êtres humains aux métaux lourds est un grave problème qui ne cesse de prendre de l'ampleur dans le monde entier. Elle s'est fortement aggravée au cours des dernières années avec l'augmentation exponentielle de l'utilisation de métaux dans les processus et produits industriels (**Sisca et al, 2009; Kinoshita et al, 2013**).

L'effet d'un métal et sa toxicité sur les sujets exposés peuvent être influencés par un certain nombre de facteurs, parmi ces facteurs, on a ceux qui sont liés au contaminant (ou facteurs extrinsèques) tels que la nature du métal, état de l'oxydation, biodisponibilité... etc (**Ali et al, 2013**). A ces facteurs, s'ajoutent des facteurs intrinsèques liés à l'âge du sujet exposé, le sexe, l'état nutritionnel, les conditions d'expositions et la variabilité génétique....etc. L'ensemble de ces facteurs peut influencer sur la charge corporelle d'un métal, sa distribution tissulaire et ses effets nocifs (**Kakkar et Jaffery, 2005**).

La toxicité des métaux varie aussi selon la dose et la durée d'exposition. Une exposition de courte durée à des concentrations élevées cause des syndromes aigus, alors que l'exposition de longues durées à de faibles concentrations provoque des troubles chroniques. L'accumulation de ces métaux toxiques comme : Hg, Cu, Cd, Cr et Zn dans les êtres humains a plusieurs conséquences telles que : la gastroentérite, la pneumonie et l'insuffisance rénale et hépatique, caractères anormaux de développement, carcinogénèse, défauts du contrôle neuromusculaire, retardation mentale, fonctionnement rénal défectueux et une large variété gamme d'autres maladies (**Rehman et al, 2006**). L'exposition aux métaux lourds provoque l'apparition de plusieurs pathologies physiques et même psychologiques. Ces derniers peuvent s'accumuler au sein de l'organisme et donc perturber son organisation interne et provoquent des effets tératogènes ou/et des troubles de la fécondité (**Sisca et al, 2009**). Le tableau (3) ci-dessous présente quelques effets nocifs des métaux sur la santé humaine.

Tableau 3. Effets nocifs des métaux lourds spécifiques sur la santé humaine

Contaminant	Effets nocifs	Référence
Arsenic	Comme l'arséniate est un analogue de phosphate il interfère ainsi avec les processus cellulaires essentiels tels que la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP.	Nies, 1999 Monachese <i>et al</i> , 2012
Cadmium	Cancérogène, mutagène, tératogène provoque une insuffisance rénale et peut-être un cancer de la prostate et une anémie chronique, ostéoporose, dysfonctionnements cardio-vasculaires	Halttunen <i>et al</i> , 2007 Qing <i>et al</i> , 2007 Zhai <i>et al</i> , 2015
Chrome	Provoque la perte de cheveux, perforations nasales, caractères anormaux dans le foie et le système de reproduction, troubles de la fonction rénale.	Rehman <i>et al</i> , 2006 Priya <i>et al</i> , 2013 Focardi <i>et al</i> , 2013
Cuivre	Des niveaux élevés endommagent le cerveau et les reins, induisent des cirrhoses du foie, des anémies chroniques et des irritations intestinales.	Nies, 1999
Plomb	Altération du développement, intelligence réduite, perte de mémoire à court terme, maladies cardiovasculaires, perturbation de la synthèse de l'hémoglobine, troubles de la fonction rénale et neurologique.	Halttunen <i>et al</i> , 2007
Mercure	Maladies auto-immunes, dépression, problèmes d'équilibre, perte de cheveux, insomnie, perte de mémoire, des troubles de la vision, des tremblements	Kiyono <i>et al</i> , 2013
Nikel	Démangeaisons de nickel; l'inhalation peut causer un cancer des poumons, du nez et des sinus, troubles cardio-vasculaires et atteintes rénales.	Nies, 1999 Li <i>et al</i> , 2014

II. Les bactéries lactiques

II.1. Principales caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) représentent un groupe de bactéries qui sont fonctionnellement liées par leur capacité à produire de l'acide lactique lors d'un métabolisme homo ou hétéro-fermentaire (Klaenhammer *et al*, 2002). Elles sont immobiles et ne sporulent pas, et ont également un métabolisme aérobie facultatif et ne produisent pas de catalase. Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique (Labioui *et al*, 2005). Certaines sont dites homo-fermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétéro-fermentaires et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate et éthanol) en général (Klaenhammer *et al*, 2002; Abbaszadeh *et al*, 2015). Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (Jasna *et al*, 2012).

II.2. Les différents genres de bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram-positif qui regroupent 12 genres bactériens (Figure 1), dont les plus étudiés sont (Holzapfel *et al*, 2001): *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* et *Weissella*.

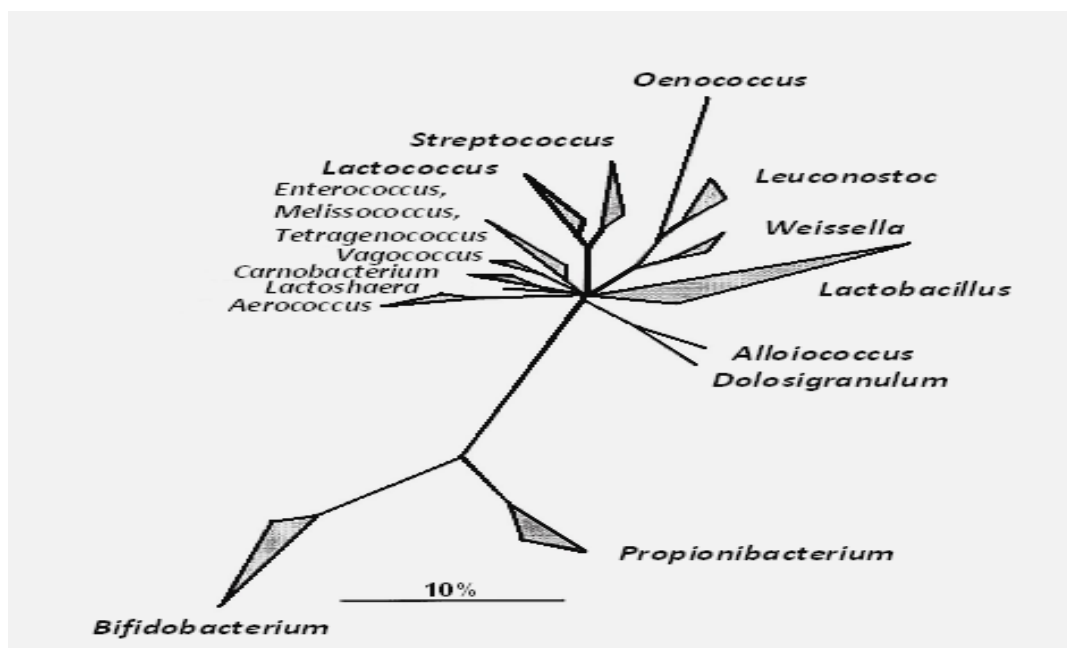


Figure 1. Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques basé sur la comparaison du gène de l'ARN 16 S (Holzapfel *et al*, 2001)

II.3. Les bactéries lactiques comme probiotiques

Les bactéries lactiques (BL) sont des microorganismes essentiels qui constituent la flore buccale, intestinale et vaginale. Ce sont des bactéries utiles à l'Homme lui permettant de fabriquer et de conserver un grand nombre de ses aliments, par la production de composés antimicrobiens tels que les acides organiques, le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène et de bactériocines pendant la fermentation (Sharma *et Srivastava*, 2014). Les bactériocines sont les antimicrobiens les plus prometteurs car ils peuvent être utilisés non seulement comme agents de conservation des aliments naturels, mais également comme agents thérapeutiques (Abbaszadeh *et al*, 2015).

Les BL probiotiques, sont des micro-organismes vivants susceptibles de produire des effets bénéfiques chez l'hôte (Madsen, 2001), par exemple la gestion de l'intolérance au lactose, la diminution du taux de cholestérol, l'amélioration de la fonction immunitaire, la prévention du cancer du côlon, et l'inhibition de l'adhésion de certains agents pathogènes. Les probiotiques tels que *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* peuvent lier le cholestérol sur leur surface cellulaire, ce qui permet sa décharge fécale efficace à l'extérieur du corps (Kinoshita *et al*, 2013; Drouault *et Corthier*, 2001).

II.3.1. Critères de sélection des BL comme probiotique

La majorité des micro-organismes utilisés comme probiotiques appartiennent aux BL et aux *bifidobactéries*. Les BL sont généralement sélectionnées pour leurs propriétés technologiques: une bonne croissance et une participation au développement de flaveur au cours de la fermentation du lait ou encore une résistance aux bactériophages en plus des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (Kinoshita *et al*, 2013).

Selon Drouault *et Corthier*, 2001, un déterminant essentiel dans la sélection d'un micro-organisme potentiel probiotique est sa capacité d'atteindre, de survivre voire de persister dans l'environnement dans lequel il doit agir. C'est pourquoi de nombreuses études visent à sélectionner les bactéries lactiques comme probiotiques qui ont les critères suivants : la sécurité, la viabilité, la résistance à l'acide gastrique et les sels biliaires, d'adhérer *in vitro* aux cellules épithéliales et de produire plusieurs substances antimicrobiennes et la capacité à coloniser le tractus gastro-intestinal (Nivoliez *et al*, 2012; Abbaszadeh *et al*, 2015). Les probiotiques se caractérisent par leur tolérance aux conditions de transit des voies gastro-intestinales humaines, leur capacité à stimuler la réponse immunitaire et leur capacité d'influencer sur les activités métaboliques, telles que la production de vitamines, du cholestérol et de l'activité d'assimilation du lactose (Zhai *et al*, 2015).

II.3.2. Importance et avantages des BL probiotiques

Les BL, notamment des lactobacilles, occupent des niches importantes dans les voies gastro-intestinales des humains et des animaux et sont considérés comme des agents qui offrent un certain nombre d'avantages probiotiques pour la santé générale et le bien-être (Pophaly *et al*, 2014). Ces avantages comprennent une influence positive sur la microflore normale, l'exclusion compétitive des agents pathogènes, et la stimulation / modulation de l'immunité (Klaenhammer *et al*, 2002). Les BL produisent une variété de composés antimicrobiens comme sous-produits métaboliques ou comme mécanisme de défense naturel (Nivoliez *et al*, 2012). Plus récemment, les BL sont utilisées dans la production de produits biologiques, y compris des biopolymères et des produits chimiques industriels (*Leuconostoc spp.*), des enzymes (*Lactobacillus brevis*), l'éthanol et l'acide lactique (*Lactobacillus casei*, *lc. lactis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. brevis*) (Sharma *et Srivastava*, 2014). Les BL sont également de bons candidats pour le développement en tant que vecteurs par voie orale pour les enzymes digestives et les antigènes des vaccins, en raison de leur tolérance à l'acide ce qui leur permet de survivre aux conditions gastriques, ce sont des éléments clés qui peuvent être exploitées pour fournir efficacement les produits biologiques à des sites ciblés (Klaenhammer *et al*, 2002).

II.3.3. Place des BL dans le microbiote intestinal

Les êtres humains naissent axéniques, c'est-à-dire, dépourvus de germes. Dans les premières heures qui suivent la naissance, l'intestin, initialement stérile est rapidement colonisé par les bactéries de l'environnement, principalement d'origine maternelle (Tableau 4), que l'on appelle « Microbiote intestinale » (Gérard, 2011; Quévrain *et Seksik*, 2013; El Kaoutari *et al*, 2014).

Tableau 4. Composition et origine des *probiotiques* dans l'intestin humain (Bouhnik, 1993; El Kaoutari *et al*, 2014)

	Origine		
	Humaine	Animale	Végétale
<i>Streptococcus thermophilus</i>		+	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		+	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+	
<i>Lactobacillus casei</i> (GG)	+		
<i>Bifidobacterium longum</i>	+		
<i>Bifidobacterium breve</i>	+		
<i>Bifidobacterium animalis</i>		+	
<i>Streptococcus faecium</i>	+		
<i>Saccharomyces boulardii</i>			+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			+

Cette flore intestinale endogène exerce de nombreuses fonctions physiologiques, telles que les réactions métaboliques (fermentation...) et un effet de barrière s'opposant à la colonisation par des microorganismes pathogènes (**Quévrain, 2014**).

Selon **Rabot, 2015**, la flore microbienne s'organise sous forme de populations, en état d'équilibre, le long du tube digestif et se divise en trois groupes :

- a) La flore dominante composée de *Bifidobacterium* et *Bacteroides*.
- b) La flore sous-dominante composée en particulier de *Lactobacillus*.
- c) La flore contaminante, potentiellement pathogène mais théoriquement absente.

La flore intestinale ainsi constituée va rester relativement stable tout au long de la vie de l'individu (**Gérard, 2011**). Cette stabilité est assurée par plusieurs facteurs physico-chimiques et par les bactéries indigènes de la flore colique qui exercent vis-à-vis des micro-organismes exogènes un effet de barrière permissif ou drastique aboutissant à leur élimination (**El Kaoutari et al, 2014**). Ces mécanismes semblent extrêmement puissants et spécifiques et la possibilité d'implanter une bactérie exogène non pathogène dans la flore dominante de l'Homme n'a pas été démontrée de façon convaincante. Les mécanismes responsables de la survenue de l'effet de barrière sont les interactions et la densité bactériennes coliques qui jouent un rôle important (**Bouhnik, 1993**).

La composition de la microflore intestinale varie en fonction de l'espèce animale et de son alimentation (**Gérard, 2011**). La flore normale est définie par la présence constante de certaines espèces dans l'intestin. Chez un individu donné, il existe également des variations quantitatives (abondances relatives de ces espèces dans l'écosystème) et qualitatives (nature des espèces bactériennes de l'écosystème) en fonction de la région intestinale (**Rabot, 2015**).

Si l'on exclut la bouche, directement en contact avec le milieu extérieur, les populations bactériennes présentes dans la lumière du tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'aux selles (**Figure 2**).

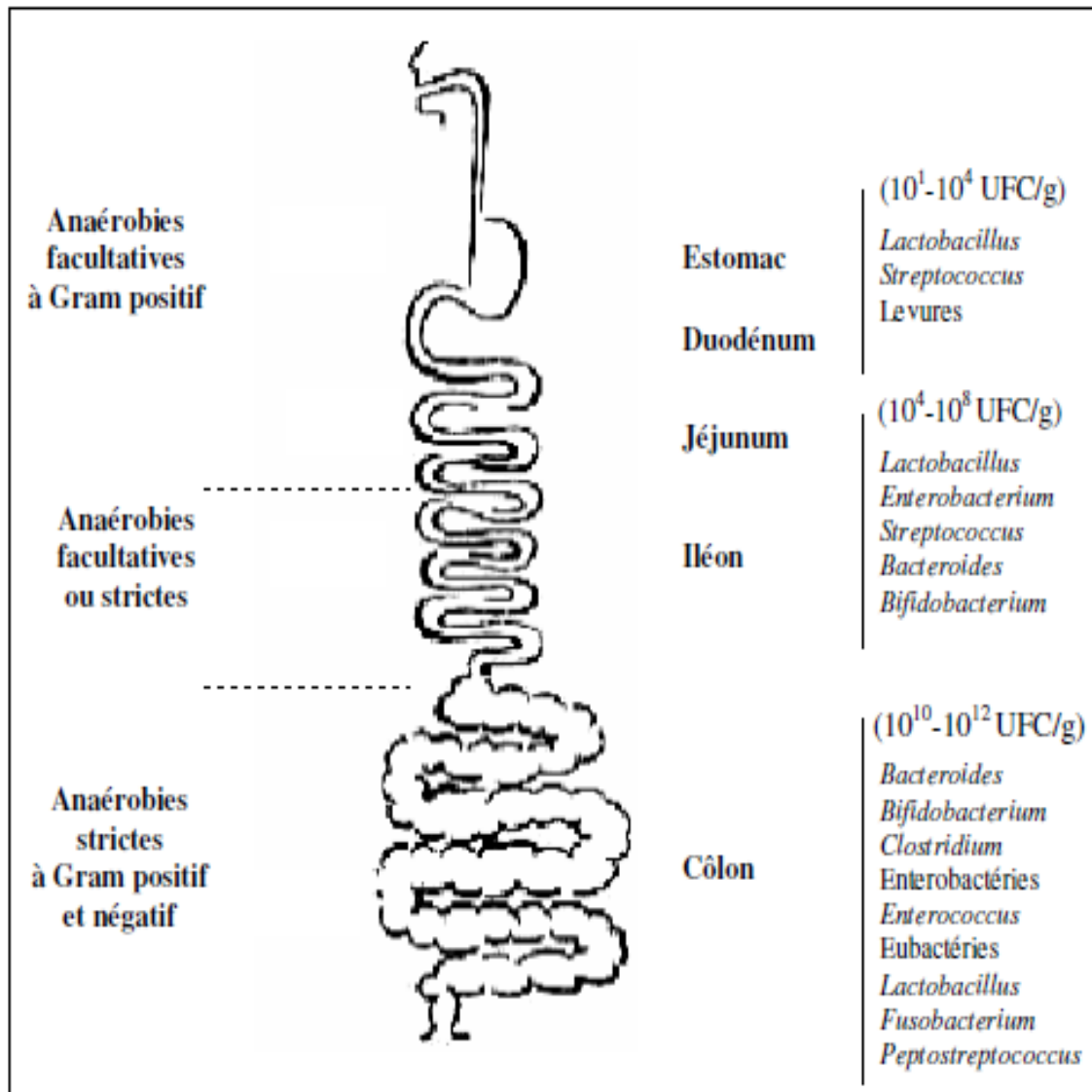


Figure 2. Composition de la microflore intestinale humaine (Holzapfel *et al*, 1998)

III. Interactions bactéries lactiques-métaux lourds

III.1. Introduction

Les interactions microbiennes avec les métaux lourds et leurs applications en désintoxication / biorestauration ont été exhaustivement étudiées, puisque ces micro-organismes ont la capacité de supprimer, d'immobiliser ou de détoxifier les métaux à travers divers mécanismes (**Lyon et Vogel, 2013; Wasi et al, 2013**). La détoxification des métaux par les microbes a été attribuée à un certain nombre de réactions qui comprennent la réduction, l'oxydation, la complexation et la méthylation (**Pandey et al, 2013; Wasi et al, 2013**). Plusieurs études ont montré que les micro-organismes en contact avec les métaux lourds sont capables de développer des mécanismes spécifiques de résistance et de détoxification comme une réponse à la toxicité de ces métaux nocifs (**Tiwary et Dubey, 2016**). Ces mécanismes de résistance peuvent être intracellulaires ou extracellulaires et peuvent être spécifiques à un métal particulier ou un mécanisme général, fonctionnant pour une variété de métaux (**Gadd, 2010; Wasi et al, 2013**).

Les travaux de recherche rapportent plusieurs études sur l'interaction des métaux lourds avec les surfaces bactériennes, mais seulement quelques travaux considèrent ces interactions au niveau moléculaire, **Beveridge, 1989**, a concentré ses études sur la morphologie microbienne et l'incorporation des métaux lourds (l'incorporation est basée sur la composition en polysaccharide de chaque organisme particulier); il a conclu que l'interaction entre les métaux lourds et les structures biologiques des surfaces bactériennes est inévitable. Cette dernière se produit par des réactions chimiques telles que la complexation et l'échange d'ions avec des composés de structure présents sur la surface des microbes et d'autres organismes (**Da Costa et Duta, 2001; Bestawy et al, 2013**).

Deux mécanismes de base qui représentent les interactions essentielles des bactéries lactiques avec les métaux lourds: la *biosorption* c'est un processus passif car il n'est pas associé au métabolisme, le métal est adsorbé sur la paroi cellulaire des bactéries. La *bioaccumulation* c'est un processus actif associé au métabolisme dont lequel le métal sous sa forme oxydée (M^+) traverse la membrane cellulaire par les phénomènes de diffusion soit à l'aide des protéines de transport (TP) à travers des canaux ioniques et s'accumule à l'intérieur de la cellule (**Figure 3**) (**Vieira et al, 2000; Jasna et al, 2012**).

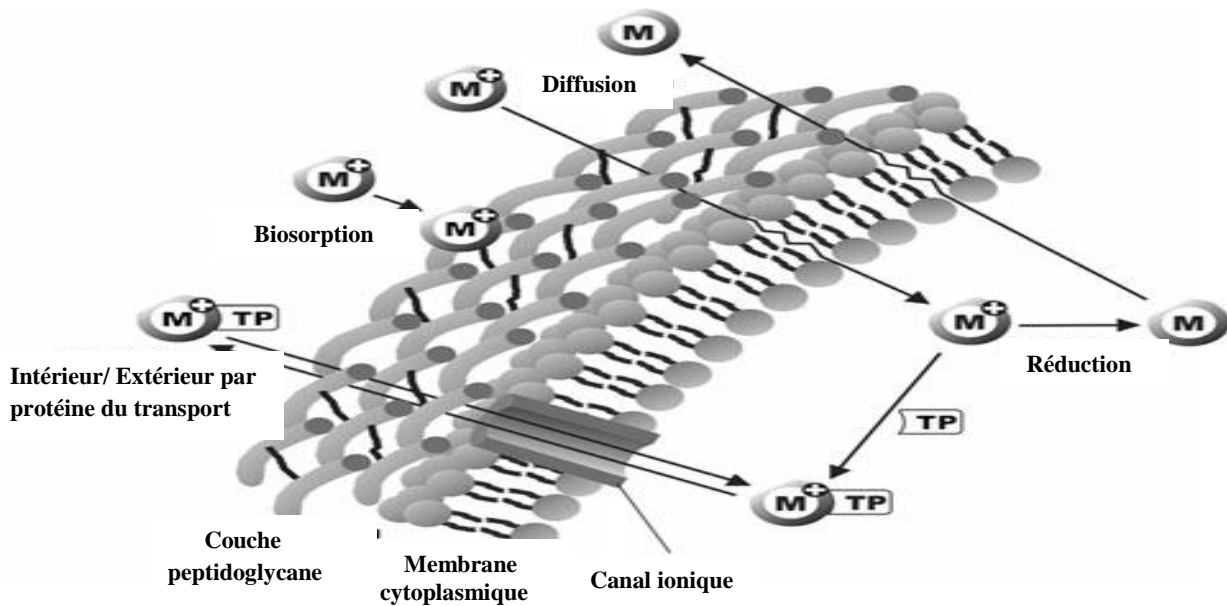


Figure 3. Interaction entre les métaux lourds et les surfaces bactériennes (Jasna *et al*, 2012)

Les bactéries à Gram positif, notamment les BL sont caractérisées par la présence des acides teichoïques associés à la paroi cellulaire, dont les groupes phosphate, les groupes carboxyle et les groupes phénols sont les éléments clés pour l'adsorption de métaux lourds (Da Costa *et Duta*, 2001; Bestawy *et al*, 2013).

Les micro-organismes ont développé plusieurs mécanismes qui répondent aux effets toxiques des métaux lourds, l'un des mécanismes les plus communs est la stimulation des protéines de liaison métalliques, suivant l'adsorption des métaux sur les cellules. Une classe bien étudiée des protéines de liaison du métal est appelé métallothionéines (MTS) ce sont des protéines de faible poids moléculaire riches en cystéine. La propriété essentielle de cette classe de protéines est leur inductibilité en réponse aux métaux (Zaharah *et al*, 2001). On peut observer une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Par exemple, plusieurs microbes ont été choisis pour catalyser ces réactions conduisant à des changements dans la mobilité des métaux dans le sol. La production de substances chélatrices des métaux telles que les composés organiques (org) ou des sulfides (S) a été également observée. Ces modifications sont effectuées lors une interaction des métaux avec le microorganisme soit par le phénomène d'adsorption passive ou par transport actif à l'intérieur de la cellule (Haferburg *et Kothe*, 2007). Les principaux types d'interactions sont résumés dans la **figure 4**.

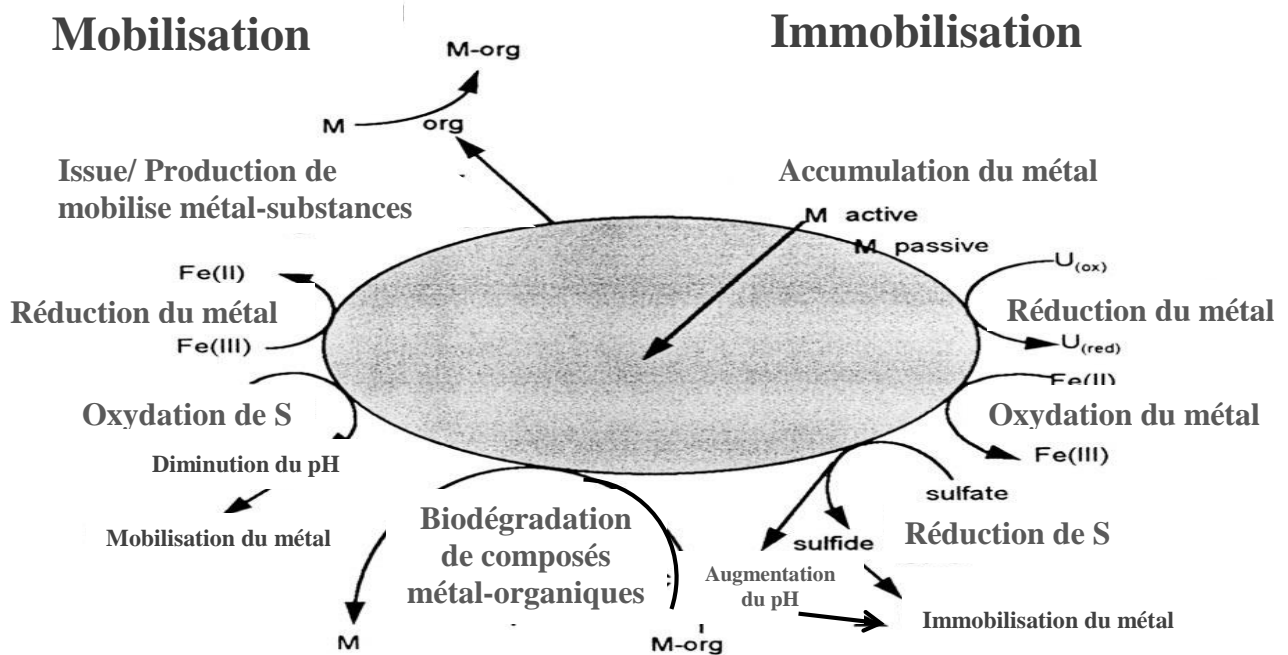


Figure 4. Mécanismes d'interaction micro-organismes-métaux lourds (Ledin, 2000)

III.2. Rôle des BL dans la détoxification des métaux lourds

Parmi les différents micro-organismes de décontamination potentiels des métaux lourds, le groupe des BL a été considéré comme le groupe d'agents biologiques naturels le plus prometteur, ce groupe a reçu beaucoup d'attention ces dernières années (Chang *et al*, 2012; Abbaszadeh *et al*, 2015). Au cours des dernières années, plusieurs études ont montré que certaines BL « probiotiques » ont des propriétés anti oxydantes qui peuvent être plus efficaces contre les métaux lourds induisant un stress oxydatif chez l'Homme. Il y a aussi des preuves considérables que les BL, telles que, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium lactis*, peuvent se lier et éliminer les métaux lourds *in vitro* (Zhai *et al*, 2015). Cette propriété résulte de la présence des polymères d'acide téichoïque au niveau de la paroi des bactéries à Gram-positif et qui confèrent une forte charge négative sur la surface de la paroi cellulaire en raison de leur teneur élevée en groupes de phosphate ionisées. De plus, l'interaction entre les BL et les métaux dépend de la formation de complexe de chélation entre la surface cellulaire des bactéries à Gram-positifs et des ions métalliques. Par conséquent, il est raisonnable que la quantité de métal accumulé par ces bactéries soit plus élevée (Tsuruta, 2006).

Les BL ont gagné une attention particulière en raison de leur capacité à produire des exopolysaccharides (EPS), qui sont des polysaccharides extracellulaires ayant une grande diversité de structures et des propriétés fonctionnelles, principalement impliquées dans l'adhésion et la protection cellulaire, les EPS sont largement utilisés comme, bio- adsorbants, et comme agents

d'élimination des métaux lourds et d'autres polluants (Surayot *et al*, 2014). Aussi bien qu'ils servent comme une barrière protectrice pour les cellules contre l'environnement externe et jouent un rôle essentiel dans la séquestration et la biosorption des ions métalliques (Bestawy *et al*, 2013). En 2004, Urbain et Kuthan ont envisagé l'application des probiotiques dans la désintoxication des xénobiotiques dans les aliments (Jasna *et al*, 2012). Ils ont également supposé que les micro-organismes probiotiques pourraient jouer un rôle dans la diminution des taux de métaux lourds consommés par l'Homme directement dans le lumen intestinal. De plus, plusieurs études ont indiqué la possibilité d'application des BL dans la désintoxication et la bioaccumulation des ions métalliques dans les produits alimentaires et les produits pharmaceutiques, comme illustré dans la figure 5 (Jasna *et al*, 2012).

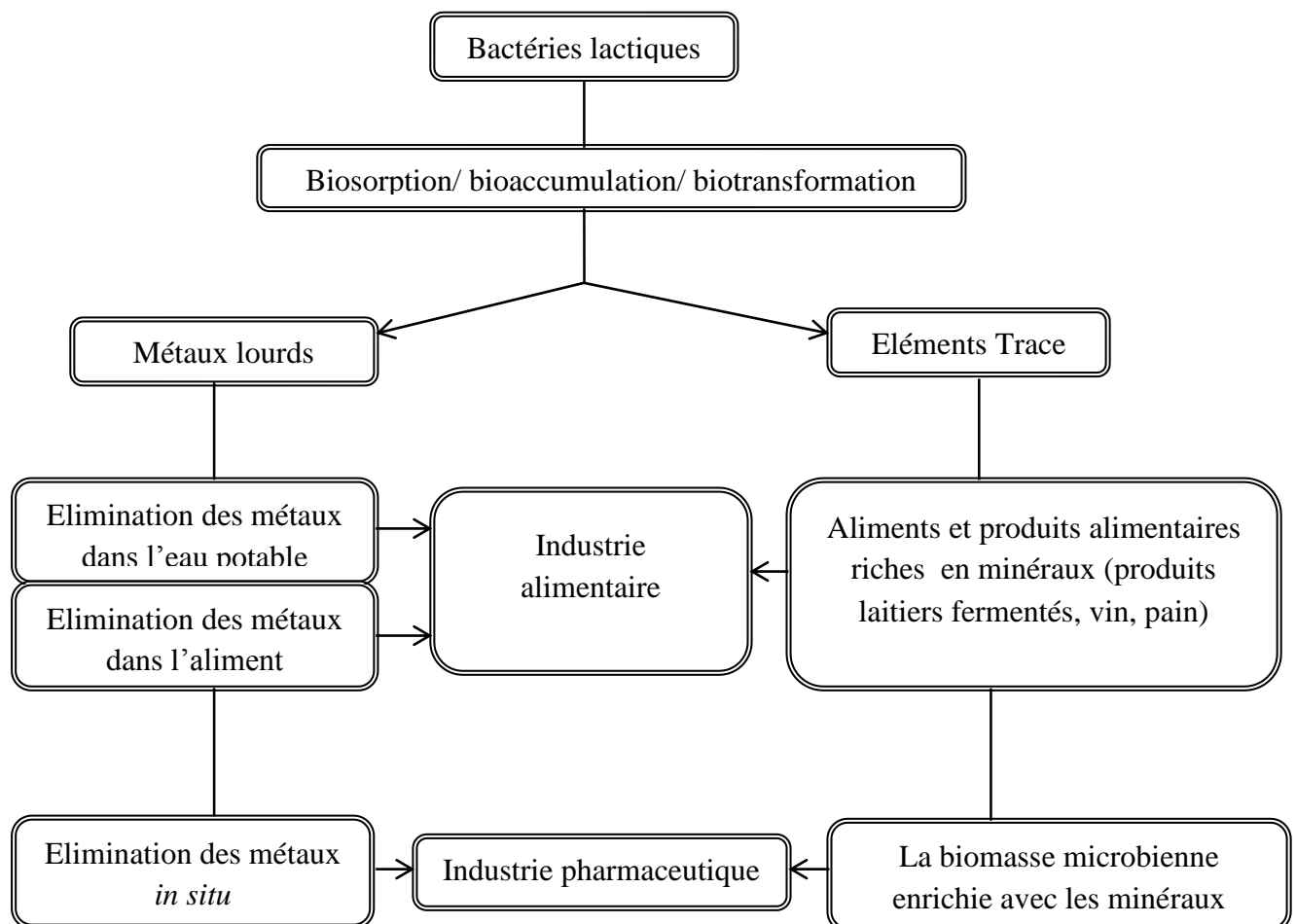


Figure 5. Application des BL dans les processus d'élimination des ions métalliques dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire (Jasna *et al*, 2012)

III.3. Les conditions d'efficacité des BL dans la désintoxication des métaux lourds

La capacité des BL à se lier au métal est un processus complexe qui dépend des caractéristiques des ions métalliques, des propriétés physiologiques des BL et des conditions physico- chimiques de l'environnement (pH, température, concentration des ions du métal) (Jasna *et al*, 2012). La consommation des BL d'une façon quotidienne pourrait être une stratégie alimentaire de protection pour les populations exposées aux métaux lourds. Le choix d'une souche probiotique potentiellement active contre la toxicité des métaux lourds, lui impose de présenter les propriétés suivantes :

D'une part, les souches de BL doivent avoir une bonne capacité de liaison au métal, ce qui leur permet d'accumuler le métal avant l'absorption intestinale de ce dernier par l'hôte et augmenter son excrétion parce que les souches seront excrétées via la matière fécale. D'autre part, comme le métal communiquera directement avec les souches dans le tractus gastro- intestinal (TGI) après exposition par voie orale, les bactéries doivent avoir une tolérance au métal pour y rester actives. En troisième lieu, la souche doit posséder une bonne capacité anti-oxydante pour fournir un effet protecteur contre le stress oxydatif induit par le métal dans le corps humain. De plus, pour éviter la perte de leur viabilité dans le TGI les probiotiques doivent être sélectionnés pour leur tolérance aux conditions des voies gastro-intestinales humaines simulées (Zhai *et al*, 2015).

III.4. Rôle des BL dans la détoxification du chrome

III.4.1. Généralités sur le chrome

Le chrome est un métal bleu- blanc qui est solide et fragile (Priya *et al*, 2013). L'élément appartient au groupe des métaux de la transition avec un nombre atomique de 24 et une masse atomique de 51.996 amu (Bradl, 2005). Il est naturellement présent dans l'environnement et notamment répandu dans les rochers, les animaux, les plantes et le sol, c'est le septième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, à des concentrations qui varient de 100 à 300 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Losi *et Frenkenberger*, 1994; Cervantes *et al*, 2001; Focardi *et al*, 2013). Il a une grande gamme d'usages dans l'industrie notamment, la préparation d'alliages, placage chromé, industrie de la teinture, industries de la tannerie, pétrole raffiné, fabrication des pigments, conservation du bois et énergie nucléaire (Mohanty *et Patra*, 2011; Focardi *et al*, 2013; Mukherjee *et al*, 2013). Le chromite (FeOCrO_2), minéral fondamental de chrome, est utilisé dans l'industrie métallurgique et dans l'industrie chimique. Donc il est disséminé dans l'environnement par un grand nombre d'opérations industrielles (Priya *et al*, 2013). Le chrome existe dans neuf états de valence qui varient de -2 à +6 dans l'environnement (Qian *et al*, 2013).

Parmi les différents états d'oxydation du chrome, les formes les plus stables et communes sont les trivalents Cr(III), qui ne sont pas toxiques et relativement insolubles dans les systèmes aqueux (**Mukherjee et al, 2013**), c'est un élément nutritif essentiel pour les êtres humains (**Thacker et al, 2007**). Le chrome se produit principalement sous forme de Cr(VI), chromate divalent de l'oxyanion ou sous forme de Cr(III), le cation trivalent (**Sundar et al, 2010; Nies, 1999**). Le trivalent Cr(III) se trouve dans la forme des oxydes, les hydroxydes ou les sulfates, alors que le l'hexavalent Cr(VI) se trouve associé habituellement avec l'oxygène comme dans les chromates (CrO_2k_4) ou les dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_2\text{k}_7$). Le chrome sous sa forme chimique hexavalente Cr^{6+} est caractérisé par une plus grande solubilité, mobilité et persistante et il est toxique plus de 300 fois, que le trivalent Cr^{3+} et toutes les formes de chrome (**Rehman et al, 2006 ; Xu et al, 2014**).

III.4.2. Effet du chrome sur la santé humaine

L'utilisation excessive et l'élimination inappropriée des effluents chargés par le chrome ont mené à une contamination des eaux de surface, des eaux souterraines, du sol, et des sédiments par le Cr(VI) ce qui pose des risques aigus et/ou chroniques sur la santé des animaux et des êtres humains (**Politi et al, 2011; Mukherjee et al, 2013**). Les eaux potables qui contiennent plus de 0.05 mg/l Cr(VI) sont considérées comme toxiques (**Bhattacharya et Gupta, 2013**).

L'exposition des êtres humains au Cr(VI) peut induire des allergies, diarrhées, irritations nasales, eczéma, ulcérations, irritations de la peau, perforations de tympan, désordres de la voie respiratoire et même des carcinomes du poumon (**Kushwaha et al, 2012**). De plus, le Cr(VI) a la capacité de s'accumuler dans le placenta, ce qui conduit à un développement fœtal anormal (**Rehman et al, 2006**). Le Cr hexavalent est tératogène et mutagène, il a été inscrit comme un polluant cancérigène humain par l'Agence de la Protection De l'environnement Américaine (US-APE) (**Qian et al, 2013**). La pollution de l'environnement par le Cr(VI) change la structure des communautés microbiennes du sol, en réduisant la croissance microbienne et les activités enzymatiques apparentées, avec une persistance de la matière organique dans les sols et une accumulation du Cr(VI) (**Bradl, 2005; Thatoi et al, 2014**). L'action toxique du Cr(VI) est dû à sa capacité de pénétrer facilement dans les membranes cellulaires, il est à l'origine d'atteintes sur ces membranes par le stress oxydatif, avec des effets tels que la perte d'intégrité de la membrane ou l'inhibition de la chaîne de transport des électrons. De plus, le Cr(VI) pénètre dans les cellules via le système de transport du sulfate de la membrane cellulaire des organismes qui sont capables d'utiliser le sulfate (**Focardi et al, 2013**).

Une fois le Cr(VI) dans les cellules, des réactions spontanées se produisent avec les réductases intracellulaires comme l'ascorbate (AsA) et la glutathione (GSH), en produisant l'intermédiaire

éphémère : le Cr (V) et/ou Cr (IV), des radicaux libres et le produit final qui est le Cr(III) comme illustré dans la figure 6 (Focardi *et al*, 2013; Gren *et al*, 2013).

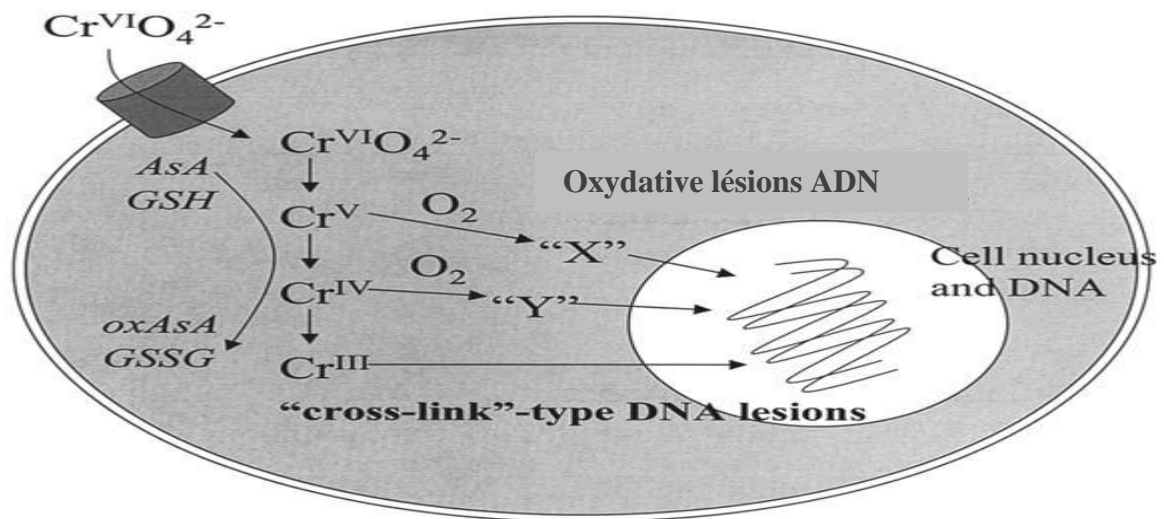


Figure 06. La réduction de l’anion chromate par les réductases ascorbate (AsA) et glutathione (GSH) en intermédiaires éphémères Cr(V) et/ou Cr(IV), radicaux libres et le produit final est le Cr(III) dans les cellules (Sarkar, 2002)

III.4.3. Interactions microbienne avec le Cr (VI)

En dépit de la toxicité du Cr(VI), quelques micro-organismes peuvent interagir avec ce métal lourd, en montrant une capacité de le réduire et de transformer le Cr(VI) en Cr(III), sous des conditions différentes (Losi *et Frankenberger*, 1994; Mahjoub *et al*, 2009). Des études ont rapporté plusieurs types de bactéries capables de réduire le Cr (VI), notamment *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Desulfovibrio* sp., *Bacillus* sp., *Shewanella* sp., *Arthrobacter* sp., *Streptomyces* sp. et *Microbacterium* sp. L’opéron du *chrBCAF* (éléments transposables comportant le gène *ChrA* et gène *ChrB*) confère aux bactéries une résistance au Cr(VI) elles synthétisent une protéine régulatrice sensible au chrome (*chromate-sensible*) (Nies, 1999).

Plusieurs mécanismes bactériens de résistance aux ions chromate ont été rapportés, parmi ces mécanismes les mieux caractérisés comprennent la réduction du Cr⁶⁺ hexavalent au Cr³⁺ trivalent et l’efflux des ions chromate du cytoplasme cellulaire (Alvarez *et al*, 1999; Nies, 1999; Focardi *et al*, 2013). L’efflux des chromates par le transporteur *ChrA* (Gène de résistance au chrome) a été également défini, en effet, le *ChrA* fonctionne comme une pompe chimiosmotique du chrome à partir du cytoplasme par une force proton-motrice (Pinaki *et al*, 2013).

D'autres mécanismes de résistance bactérienne au chrome ont été suggérés, ces mécanismes sont en rapport avec l'expression des composants des systèmes de réparation de l'ADN et aussi, en rapport avec les mécanismes d'homéostasie du fer et du soufre (**Focardi et al, 2013**).

Plusieurs chercheurs ont rapporté l'élimination du Cr(VI), de l'eau ou du sol par des micro-organismes de l'environnement. Les travaux mettant le point sur le rôle que peuvent jouer les BL notamment les Lactobacilles dans la désintoxication du chrome hexavalent dans le tube digestif ou dans les aliments sont très rares voire inexistantes et c'est sur ce point que notre travail se focalise essentiellement.

Matériel et Méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Toxicologie Moléculaire, et du laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, sur une période de 12 mois.

Notre travail avait pour objectifs de recouvrir les points suivants :

01. Purification et repiquage des bactéries lactiques d'origine locale
02. Screening des bactéries lactiques ayant la capacité de croître en présence des métaux lourds
03. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)
04. Etude de la cinétique de la croissance des bactéries lactiques en présence des métaux lourds (densité optique « DO »)
05. Bioaccumulation des métaux lourds par les bactéries lactiques.
06. Evaluation biologique des aptitudes probiotiques de la bactérie lactique *in vitro*.

I. Matériel

Au cours de cette étude, nous avons utilisé le matériel suivant :

I.1. Les souches bactériennes

I.1.1. Bactéries lactiques

Les souches de bactéries lactiques utilisées dans cette étude ont été aimablement fournies par **Prof. Tayeb Idoui** (Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé, Université de Mohammed Seddik Benyahia, Jijel).

Tableau 05. Les souches de bactéries lactiques utilisées

Souches	Code	Origines
<i>Streptococcus salivarius ssp thermophilus</i>	St.sa	Lait
<i>Lb. plantarum</i>	G1	Gésier du poulet
<i>Lb. plantarum</i>	15	Lait
<i>Lb. curvatus</i>	Bj432	Beurre de Jijel
<i>Lactobacillus sp</i>	T5	-
<i>Lactobacillus sp</i>	05	-
<i>Lb. confusus</i>	Lb.con	Selles humaines (APich 50+Logiciel)
<i>Lactobacillus sp</i>	45	-
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	CHT24	Lait de Chamelle
<i>Lb. delbrueckii spp lactis</i>	Lb. del	Selles de nourrissons

I.1.2. Bactéries de référence

Les souches de référence utilisées dans cette étude ont été aimablement fournies par M^{me} **Hamida Bouridane** (Laboratoire de Toxicologie Moléculaire, Faculté de Sciences, Université Mahammed Seddik Benyahia, Jijel).

Tableau 06. Les souches de référence utilisées

Souches	Code
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922

I.2. Milieux de culture

Les milieux de culture suivants ont été utilisés:

- Gélose MRS et bouillon MRS (Man Rogosa Sharpe): pour la culture des bactéries lactiques ; (Institut Pasteur, Alger).
- Gélose nutritive (GN) et bouillon nutritif (BN) : pour la culture des bactéries pathogène ; (Institut Pasteur, Alger).

I.3. Produits chimiques :

- Nitrate de plomb $(\text{PbNO}_3)_2$ été utilisé comme source de Pb (II)
- Dichromate de potassium $(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)$ été utilisé comme source de Cr (VI)
- Nitrate de fer $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ été utilisé comme source de Fe (III)
- Le chlorure de mercure HgCl_2 été utilisé comme source de Hg (II)

II. Méthodes

II.1. Revivification des souches

La revivification des souches est une étape essentielle avant chaque test. Les souches utilisées dans ce travail sontensemencées, dans des conditions d'asepsie, dans 5 ml de bouillon MRS, ensuite elles sont incubées à 37 °C pendant 18 h.

II.2. Préparation des solutions mères de métaux lourds

Pour obtenir des concentrations différentes de sels des métaux, des solutions mères (1000 mg/L) Hg (II), Pb (II), Fe (III) et Cr (VI), ont été préparées en dissolvant des pesées appropriées de (HgCl_2), ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$), et ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), respectivement, dans l'eau distillée puis stérilisées par autoclave (**Bhakta et al, 2012**).

SM1: Plomb 1000 mg/L

Masse molaire du ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) = 538.4 g/mol

Masse molaire du (Pb) = 207.2g/mol

$$m = 1000 * 538.4 / (207.2)*2 = 1.3 \text{ g}$$

Pour préparer la solution mère à 1000 mg/l, donc 1.3 g de nitrate de plomb sont dissous dans 1L d'eau distillée (**Kinoshita et al, 2013**).

SM2 : Fer 1000 mg/L

Masse molaire du ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) = 241.84 g/mol

Masse molaire du (Fe) = 55.84 g/mol

$$m = 1000 * 241.86/55.84 = 4.3\text{g}$$

Pour préparer la solution mère à 1000 mg/l, donc 4.3g de nitrate de Fer sont dissous dans 1L d'eau distillée (**Guo et al, 2010**).

SM3: Chrome 1000 mg/L

Masse molaire du ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) = 294.16 g/mol

Masse molaire du (Cr) = 51.99 g/mol

$$m = 1000 * 294.16/(51.99)*2 = 2.83 \text{ g}$$

Pour préparer la solution mère à 1000 mg/l, 2.83g de dichromate de potassium sont dissous dans 1L d'eau distillée (**Guo et al, 2010**).

SM4:Mercure1000 mg/L

Masse molaire du (HgCl_2) = 271.496 g/mol

Masse molaire du (Hg) = 200.59 g/mol

$$m = 1000 * 271.496/200.59 = 1.35\text{g}$$

Pour préparer la solution mère à 1000 mg/l, 1.35g de chlorure de mercure sont dissous dans 1L d'eau distillée (**Guo et al, 2010**).

II.3. Purification et repiquage des bactéries lactiques d'origine locale

A partir des cultures conservées au congélateur (0°C), une inoculation sur bouillon MRS a été réalisée, ensuite 10 boîtes de gélose MRS sontensemencées par stries à partir des 10 tubes de bouillon MRS incubées à 37°C pendant 24 h. Après vérification de la pureté, on conserve les souches sur gélose MRS inclinée à 4 °C et dans du glycérol à 0 °C. La culture est renouvelée chaque mois.

II.4. Réalisation d'une courbe d'étalonnage pour la quantification des cellules par spectrophotométrie

Les souches bactériennes utilisées ont été activées sur bouillon MRS, incubées à 37°C pendant 18 h. Ensuite les cellules ont été recueillies par centrifugation et lavées trois fois avec l'eau physiologique stérile. Après avoir effectué une série de dilutions décimales dans l'eau physiologique, la concentration cellulaire est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm avec un spectrophotomètre UV-visible, ensuite 100 µl de la suspension sont étalés sur gélose MRS et incubées 48 h à 37 °C.

Les colonies bactériennes ont été dénombrées, et exprimés en UFC/ml. La courbe d'étalonnage est tracée en portant la DO à 600 nm en fonction du nombre d'UFC/ml (**Annexe 8**). Nous pouvons déduire la concentration bactérienne initiale en unités formant colonies (UFC) par millilitre, selon la formule qui suit (**Madigan et Martinko, 2007**):

$$\text{UFC/ml} = n \times (1/d) \times (1/v)$$

n : nombre de colonies

d : dilution

v : volume

II.4.1. Calcul du taux de croissance bactérienne

Le taux de croissance bactérienne μ (μ/h) est calculé en utilisant l'équation suivante (**Wei et al, 2009**)

$$\mu = \frac{1}{DO_0} \times \frac{(DO_t - DO_0)}{(T_t - T_0)}$$

DO_t : densité optique à un temps t

DO₀ : densité optique au temps initial

T_t : temps après incubation

T₀ : temps initial

II.5. Screening des bactéries lactiques ayant la capacité de croître en présence des métaux lourds

Le test de screening permet de sélectionner les souches les plus efficaces ayant la capacité la plus importante de croître sur le bouillon MRS contenant différents métaux : chrome hexavalent, plomb, mercure, fer. Les 10 souches bactériennes ont été inoculées dans des erlenmeyers de 250 ml stériles, (à titre de 2% (v/v) de l'inoculum dans 100 ml de bouillon MRS), qui contiennent 10 mg/L de Hg (II), Pb (II), Fe(III) et Cr (VI). Parallèlement, un témoin ne contenant que du bouillon MRS et la culture, a aussi été préparé pour chaque souche bactérienne (**Guo et al, 2010; Kinoshita et al, 2013**).

Puis, les erlenmeyers ont été incubés à 37 °C sous agitation à 150 rpm, les échantillons ont été pris à intervalles de temps prédéfinis (T_0 , T_{24} , T_{48}) pour la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- visible (**Guo et al, 2010**).

II.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches bactériennes sélectionnées (05, 45, CHT₂₄, St.sa) pour le mercure (Hg) a été étudiée avec différentes concentrations en métal, variant de 10 jusqu'à 100 mg/l. Dans des erlenmeyers de 250 ml, sont ajouté 100 ml de bouillon MRS stérile contenant des concentrations différentes d'Hg. Tous les flacons étaient aseptiquement inoculés avec 2% (v/v) par les souches, suivie par une incubation à 37 °C sous agitation à 150 rpm.

La DO_{600nm} était mesurée avant incubation T_0 et après incubation à T_{24} . Ce test permet de déterminer la plus faible concentration du métal donnant lieu à une inhibition totale de la croissance bactérienne et la sélection de la souche la plus résistante au mercure (**Guo et al, 2010**).

Pour mesurer la concentration minimale inhibitrice des autres métaux pour la souche (St.sa), nous avons utilisé la méthode de dilution sur tube qui consiste à faire une série de dilutions croissantes de la solution mère du métal (plomb, chrome hexavalent et fer) selon le protocole suivant :

Premièrement, la souche bactérienne a été cultivée dans du bouillon MRS pendant 18 h à 37 °C. Après incubation, 200 µl de l'inoculum de St.sa ont été transférés dans chaque tube contenant des concentrations croissantes en Pb, Fe et Cr(VI) (de 10 à 500 mg/l) obtenues par dilution des solutions mères (SM1, SM2 et SM3) ayant une concentration de 1000 mg/l, avec un volume final de 10 ml du bouillon MRS pour chaque tube (**Hassen et al, 1998**). D'autre part, une deuxième série de tubes représentant un blanc pour chaque concentration est aussi préparée. Les densités optiques sont mesurées à 600 nm après une période d'incubation de 24 h 37 °C. La concentration minimale en métal qui inhibe complètement la croissance bactérienne a été prise comme CMI.

II.7. Etude de la cinétique de croissance de la BL sélectionnée (St.sa) en présence du chrome

L'influence des métaux lourds sur la croissance de la souche « St.sa » la plus résistante au mercure et au chrome hexavalent, a été analysée dans des erlenmeyers de 250 ml stériles, la souche bactérienne (St.sa) préalablement activée a été inoculée à titre de 2% (v/v) dans 50 ml de bouillon MRS en présence d'une concentration croissantes (de 50 à 500 mg/l) en Cr (VI) (**Kinoshita et al, 2013**).

Parallèlement, le bouillon MRS qui ne contient pas le métal lourd a été utilisé comme contrôle. Après une incubation à 37°C sous agitation, la DO à 600 nm a été mesurée pour chaque erlenmeyer toutes les 2h (**Kinoshita et al, 2013**).

II.8. Etude des interactions du chrome avec la souche (St.sa)

Afin de suivre la variation de la concentration du chrome dans le temps, quatre essais sont réalisées et les tests ont été répétés deux fois (**Shakouri et al, 2000**):

- **Le 1^{er} essai:** Dans un erlenmeyer de 250 ml stérile, nous préparons un volume final de 100 ml constitué de bouillon MRS, d'une concentration de 50 mg/L en Cr (VI), etensemencé par 2 % de la culture bactérienne fraîches.
- **Le 2^{ème} essai:** Les mêmes étapes du 1^{er} essai sont répétées, le milieu est néanmoins dépourvu de Cr (VI), et cela pour estimer la quantité de Cr intracellulaire initiale pour évaluer la bioaccumulation du Cr, en comparaison avec le 1^{er} essai.
- **Le 3^{ème} essai:** Les mêmes étapes du 1^{er} essai sont suivies, cette fois-ci, le milieu est dépourvu de la culture bactérienne, pour évaluer l'impact des facteurs abiotiques sur le devenir du chrome.
- **Le 4^{ème} essai:** Le milieu contient la biomasse bactérienne autoclavée et avec le chrome hexavalent, cet essai est réalisé pour évaluer la quantité du chrome adsorbé à la surface cellulaire. Les erlenmeyers recouverts par le coton et du papier aluminium, sont ensuite incubés à 37 °C sous agitation pendant une durée de 72 h.

Pour suivre l'évolution de la concentration du chrome dans le temps, des échantillons de 10 ml sont prélevés plusieurs fois en T₀, T₂₄, T₄₈ et T₇₂ dans des conditions d'asepsie. Les échantillons sont centrifugés pendant 20 min à 6000 rpm pour obtenir un surnageant exempt de cellules microbiennes (**Bhattacharya et Gupta, 2013**). Parallèlement, d'autres prélèvements sont effectués toutes les 24 h pour suivre la cinétique de croissance de la souche St.sa, de la même manière que précédemment et tout au long du test.

II.8.1.Méthode colorimétrique de dosage du chrome

La mesure de la concentration de Cr (VI) dans chaque étape a été effectuée selon la méthode colorimétrique standard de (**Greenberg et al, 1985**). Le Cr (VI) de l'échantillon à analyser réagit avec un agent complexant, le 1,5- diphenylcarbazine en milieu acide. Ainsi, après 10 à 15 minutes, le complexe formé donne la couleur rose violacé dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en chrome hexavalent et est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm (**Park et al, 2000**).

a- Préparation de la solution acide de diphenylcarbazine (DPC)

On dissout 0,2 g de 1,5- diphenylcarbazine chimiquement pure dans un volume de 100 ml d'alcool éthylique à 95°. Ensuite, 400 ml de la solution d'acide sulfurique de concentration 176 g/L (100 ml d'acide sulfurique dans 1 L d'eau distillée) sont ajoutés. Cette solution se conserve dans un flacon teinté au réfrigérateur, et reste stable pendant un mois environ (**Rodier et al, 2009**).

b-Etablissement de la courbe d'étalonnage du chrome

Une solution fille étalon de chrome à 5 mg/l est obtenue par dilution de 5 ml de la solution mère de chrome dans 1 L d'eau distillée. Puis, à partir de cette solution fille, nous avons préparé des dilutions avec un volume final de 50 ml couvrant la gamme de concentrations suivante : 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 mg/l (Marzouk Trifi, 2012).

c- Mode opératoire

Dans une fiole jaugée, nous avons introduit 50 ml de l'échantillon et 3 ml de la solution acide de diphenylcarbazide. Après avoir bien homogénéisé, nous avons laissé le mélange au repos pendant 10 minutes pour permettre un développement complet de la coloration rouge-violet.

Un blanc dans les mêmes conditions avec 50 ml de bouillon MRS a été préparé. Ensuite, nous avons effectué les lectures au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm (Priya *et al*, 2013). A partir des valeurs de DO mesurées à 540 nm pour les solutions étalons, nous avons tracé la courbe d'étalonnage du chrome (Annexe 10), et les concentrations du Cr (VI) des échantillons sont tirées et calculées à partir de cette courbe étalon selon la relation de (CEAEQ, 2008) :

$$C_f = C_0 \times F$$

C_f : concentration final en Cr (VI) de l'échantillon

C_0 : concentration en Cr (VI) tirée à partir de la courbe d'étalonnage

F : facteur de dilution

II.8.2. Le taux de réduction du chrome

Le taux de réduction du chrome R% est calculé en utilisant la formule suivante (Priya *et al*, 2013):

$$R\% = [(C_0 - C_t) / C_0] \times 100$$

C_0 : concentration initiale du Cr (VI)

C_t : concentration du Cr (VI) en temps t

t : temps d'incubation.

II.8.3. Lyse des cellules bactériennes

Après 72h d'incubation, deux ultimes échantillons (5 ml) à partir des essais 1 et 2 (II-8) sont prélevés dans deux tubes à hémolyse, les deux échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 6000 rpm.

Après élimination du surnageant, le 1^{er} tube servira pour la mesure du poids sec de la biomasse, tandis que le 2^{ème} tube servira pour la lyse cellulaire. Le culot ainsi récolté est lavé trois fois avec l'eau déionisée et la lyse cellulaire est induite par l'addition de 5 ml d'acide nitrique à 1% pendant 24h à 4 °C.

Par la suite, le lysat bactérien est centrifugé pendant 10 mn à 6000 rpm, et le surnageant obtenu après centrifugation, a été filtré par des filtres millipores 0.22µm, il servira pour l'évaluation de la concentration intracellulaire du Cr accumulé (Nithya *et al*, 2011; Deng *et Wang*, 2012).

La quantité de chrome accumulé est calculée et exprimée en : mg Cr/g du poids sec de la biomasse (Srinath *et al*, 2002).

II.8.4. Détermination du poids sec de la biomasse

Le poids sec de la biomasse est déterminé en déduisant le poids du tube contenant le culot après séchage dans l'étuve à 80 °C ($2,9953 \pm 0.0028$ g) du poids du tube vide pesé au préalable (2,9639 g), il ressort que le poids sec de la biomasse est de 0.0314 ± 0.0028 g /5 ml du volume initial de la suspension cellulaire. Donc, le poids sec en mg de biomasse/unité de volume est de : 6.28 ± 0.0028 mg/ml.

II.9. Evaluation biologique des aptitudes probiotiques *in vitro*

II.9.1. Tolérance aux acides

La tolérance de la souche à l'acidité a été réalisée selon la méthode de De Valdez *et Taranto* (2001) et Lee *et al* (2016) avec une modification du protocole de comptage des cellules.

D'une part, le pH du bouillon MRS a été ajusté à pH 6.4, pH 2 et pH 3 par du HCl 5M, stérilisé par filtration (0.22 µm) et conservé à température ambiante avant son utilisation. D'autre part, nous avons préparé une culture jeune de la bactérie lactique (18 h d'incubation à 37°C) dans du bouillon MRS (pH 6.4), les cellules sont récupérées par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 mn, le culot obtenu est lavé deux fois avec le tampon phosphate (PBS) 0.1 M, pH 7.0. Finalement, les cellules sont suspendues au volume original avec le tampon phosphate par agitation.

Un inoculum de 2% de la suspension bactérienne a été ajouté aux bouillons MRS à pH 6.4, pH 2 et pH 3 puis incubés à 37 °C sous agitation pendant 4 heures, des échantillons de la culture ont été prélevés chaque deux heures (T_{0h} , T_{2h} , T_{4h}) pour un dénombrement des cellules sous microscope optique à l'aide d'une cellule de malassez. Ainsi le taux de survie a été estimé par la suite. Ce test a été répété deux fois.

II.9.2. Tolérance aux sels biliaires

Le test a été réalisé selon la technique décrite par **De Valdez et Taranto (2001)**.

a- Préparation du bouillon MRSO (1 L)

Le bouillon MRSO c'est du bouillon MRS à pH 6.4, additionné de 0.5, 1, 1.5, et 3 g de sels biliaires pour obtenir une concentration finale de 0.05%, 0.1%, 0.15%, et 0.3%, respectivement puis stérilisé par autoclavage.

b- Protocole expérimental

A partir d'une culture jeune (18h d'incubation), les cellules sont récupérées de la culture par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 mn, le culot obtenu est lavé deux fois avec du tampon phosphate (PBS) 0.1 M, pH 7.0.

Ensuite, les cellules sont suspendues au volume original avec le tampon phosphate. A partir de ce volume, nous inoculons (0.5 %) de la suspension bactérienne dans les milieux MRS et MRSO qui est ensuite incubés à 37 °C sous agitation, des échantillons de 1 ml ont été recueillis de la culture pour la mesure de la densité optique à 560 nm ($DO_{560\text{ nm}}$) chaque heure pendant 7 h. Ce test a été répété deux fois.

Selon **De Valdez et al, (2001)**, la tolérance aux sels biliaires est déterminée par comparaison des deux cultures (sans stress et avec stress) en se basant sur le temps nécessaire pour chacune d'elles à atteindre une même valeur de la $DO_{560\text{ nm}}$ correspondant à la croissance cellulaire (généralement, cette valeur est trouvée dans la phase exponentielle précoce) dans le milieu MRS et les milieux MRSO; la différence dans le temps (min) entre les milieux de culture est considérée comme le retardement (décalage) de la croissance (D) où :

$$D = T_2 - T_1.$$

D : retardement de la croissance

T_1 : temps de croissance dans le milieu MRS sans bile.

T_2 : temps de croissance dans le milieu MRSO.

II.9.3. Pouvoir antagoniste de la souche sélectionnée

Il s'agit d'étudier l'activité inhibitrice de la bactérie lactique envers des souches de référence : *E.coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, et *Pseudomonas*. Pour mettre en évidence cette activité, nous avons utilisé la méthode de diffusion par disque sur milieu gélosé décrite par **Labioui (2005)**.

Les souches bactériennes de référence sontensemencées dans le bouillon nutritif et incubées à 37 °C pendant 4 h, pour optimiser leur croissance. Un ensemencement est réalisé par l'ajout de 10 µl de la

culture pathogène dans 20 ml de la gélose nutritive, le milieu est homogénéisé puis coulé dans des boîtes de Pétri, et laissé refroidir. Une culture jeune de la bactérie lactique *Streptococcus salivarius* ssp. *Thermophilus* (âgée de 18 h sur bouillon MRS) a été centrifugée à 6000 rpm pendant 15 mn, le surnageant obtenu est filtré par des microfiltres (0.22 µm). Après séchage de la gélose, des disques en papier Wattman stériles (de 5 mm de diamètre) étaient imbibés par 50 µl du surnageant filtré de la souche jeune de la bactérie lactique à tester et déposés à la surface de la gélose déjàensemencée. Puis, les boîtes sont incubées à 4 °C pendant 4 h pour permettre une bonne diffusion du surnageant. Ensuite l'incubation est faite à 37 °C pendant 24 h. L'activité antagoniste est révélée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques.

Résultats et Discussion

Dans notre étude, nous avons choisi de travailler avec les sels de Pb(II), Hg(II), Fe(III) et Cr(VI), considérés comme les polluants les plus toxiques de l'environnement. Le fer appartient aux métaux de la transition qui devient toxique à la cellule quand sa concentration intracellulaire dépasse une certaine limite, tandis que le plomb, le mercure et le chrome hexavalent sont considérés pour être toxiques même à faible concentration.

I.1. Criblage des souches résistantes aux métaux

La croissance des cellules bactériennes était évaluée, en mesurant la densité optique (DO) de chaque culture, à 600nm sur une durée de 48h à raison d'une mesure chaque 24h.

Les **figures (7-16)** représentent les résultats sous forme de courbes de variation de la de croissance dans le temps des dix souches cultivées dans le bouillon MRS en absence et en présence du métal.

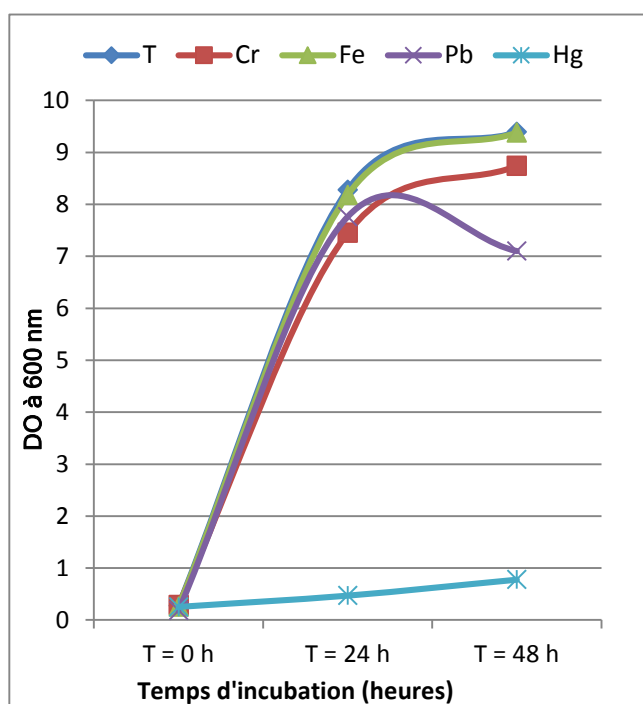


Figure 7. Croissance de la souche *Lactobacillus* sp (45) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48h

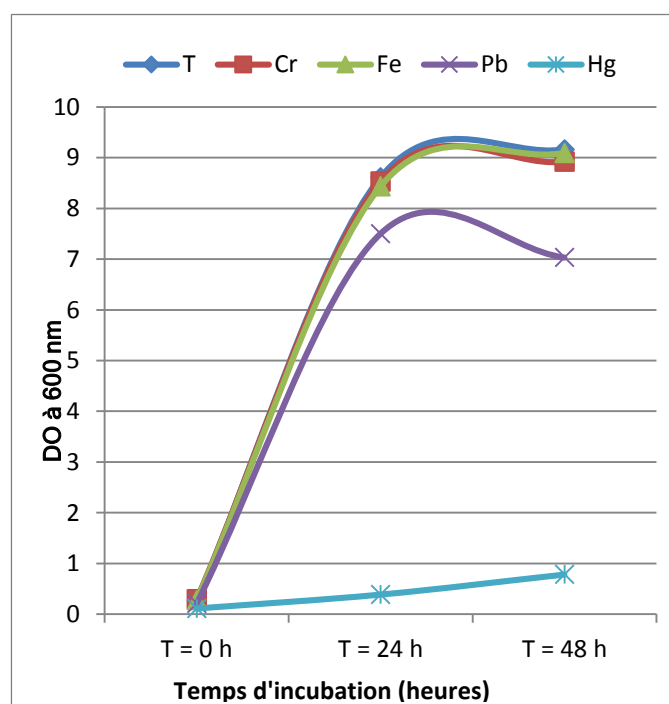


Figure 8. Croissance de la souche *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48h

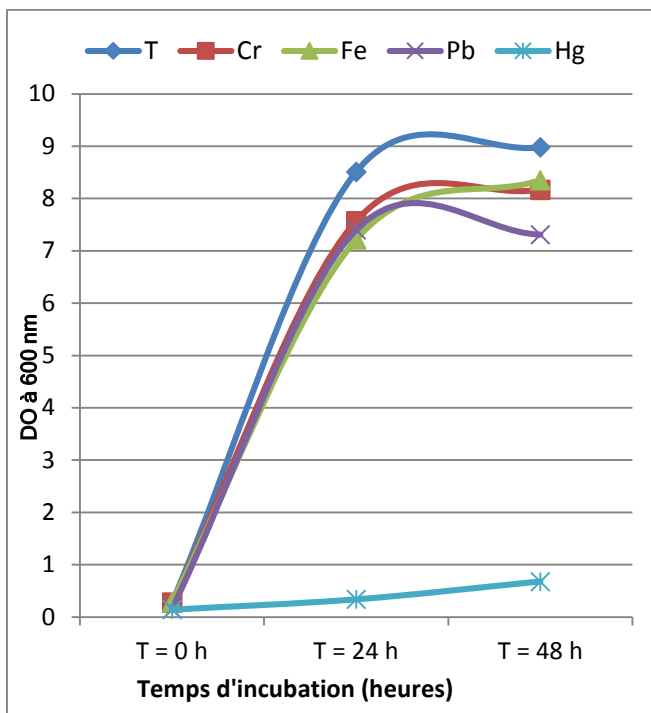


Figure 9. Croissance de la souche *Lactobacillus* sp (T5) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubé à 37 °C pendant 48h

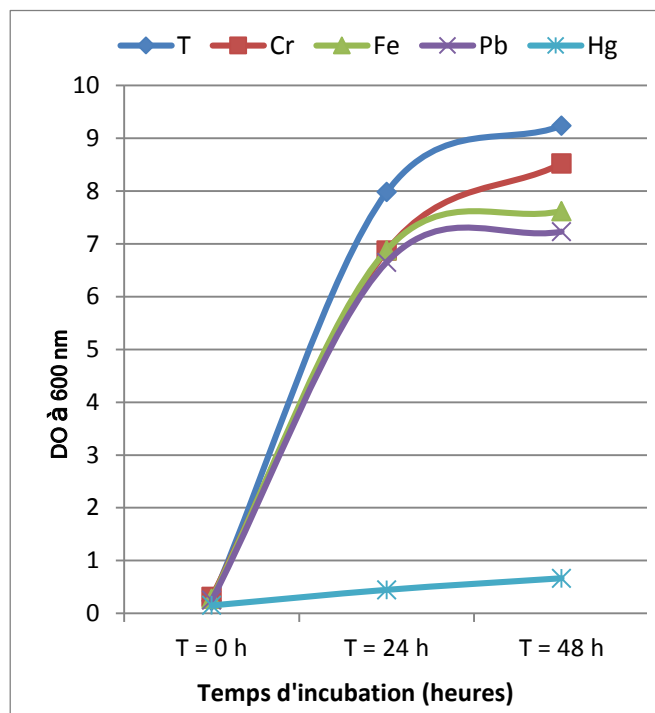


Figure 10. Croissance de la souche *Lb. Delbrueckii* spp *lactis* (Lb.del) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubée à 37 °C pendant 48 h.

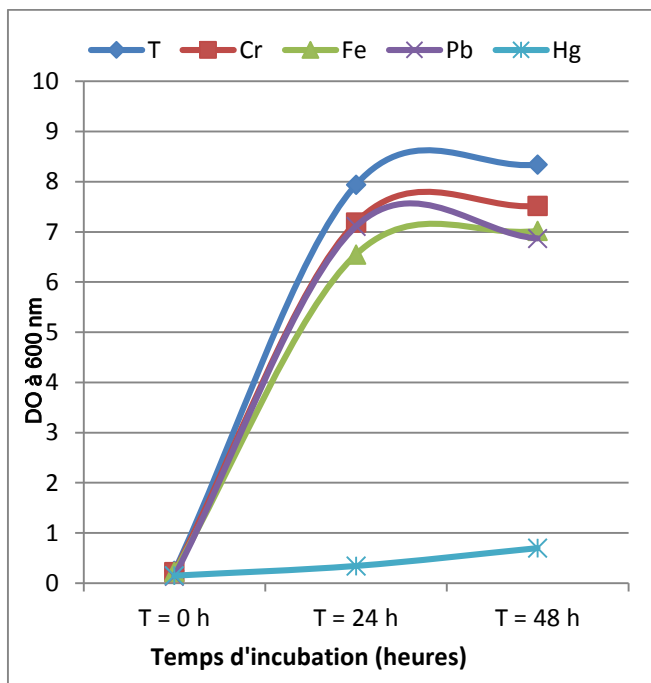


Figure 11: Croissance de la souche *Lb. confusus* (Lb.con) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubée à 37 °C pendant 48h.

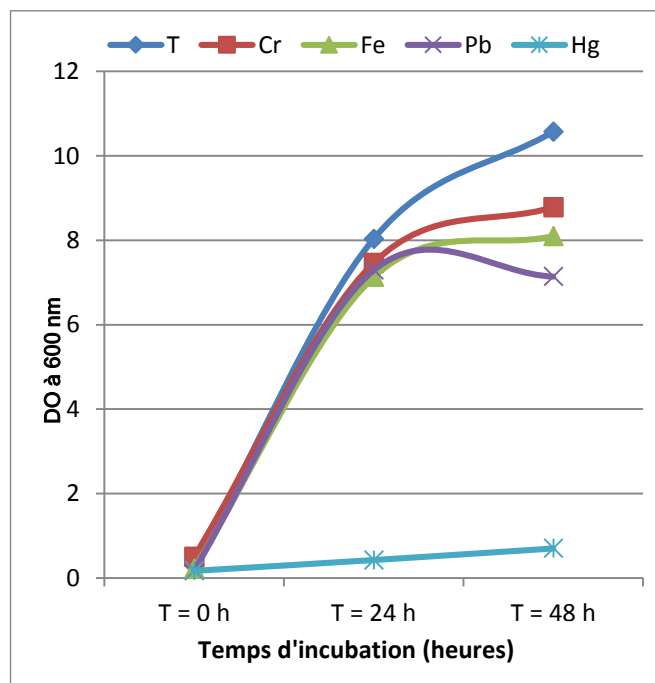


Figure 12: Croissance de la souche *Lb. plantarum* (15) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubée à 37 °C pendant 48 h.

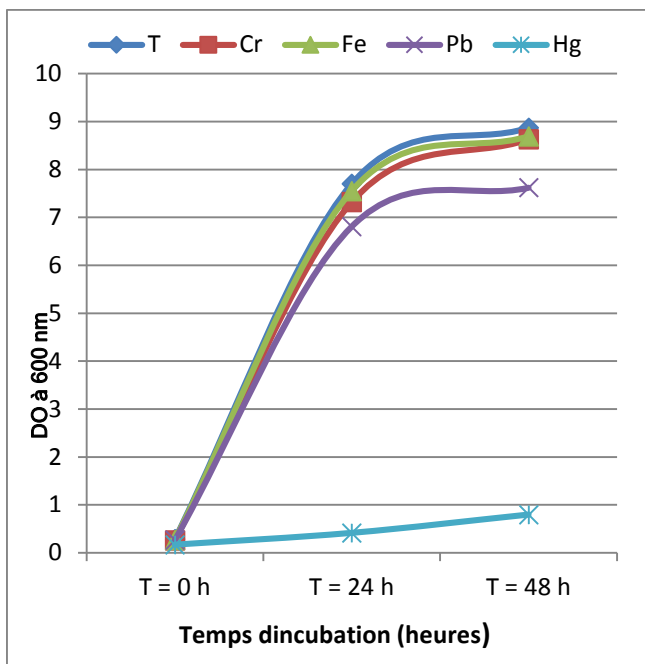


Figure 13. Croissance de la souche *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (CHT₂₄) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubée à 37 °C pendant 48 h.

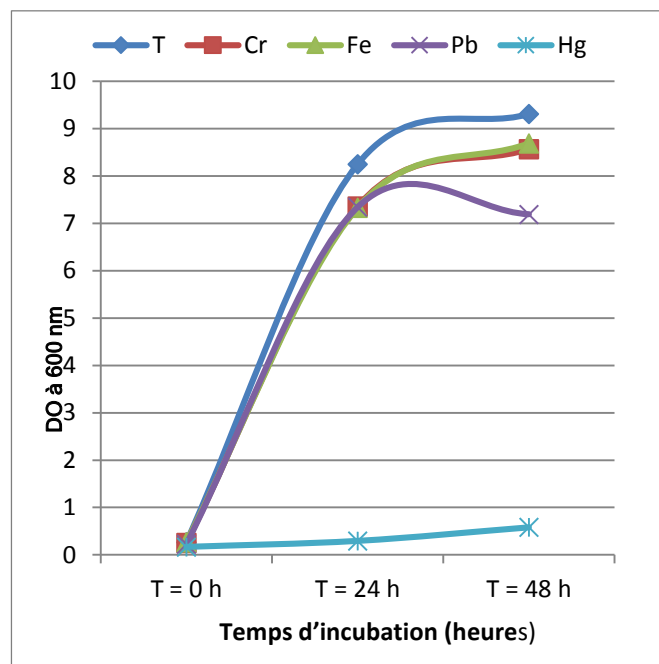


Figure 14. Croissance de la souche *Lb. curvatus* (Bj432) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubée à 37 °C pendant 48h.

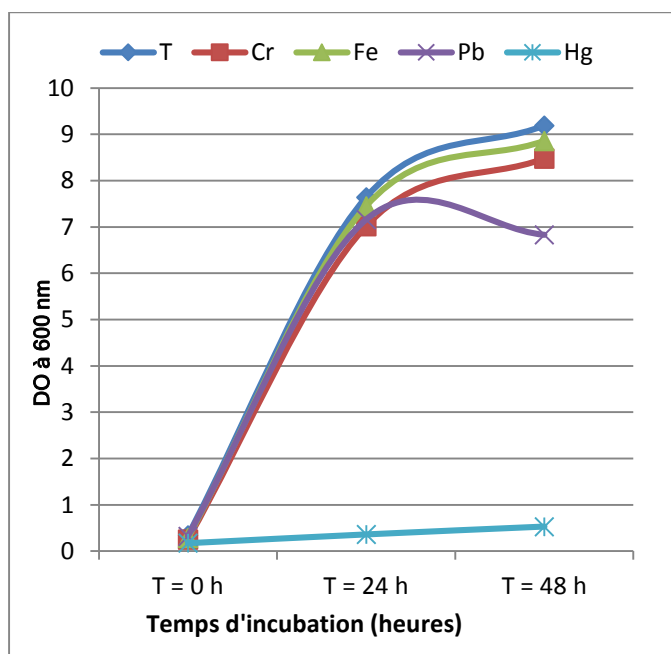


Figure 15. Croissance de la souche *Lb. plantarum* (G1) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubée à 37 °C pendant 48 h

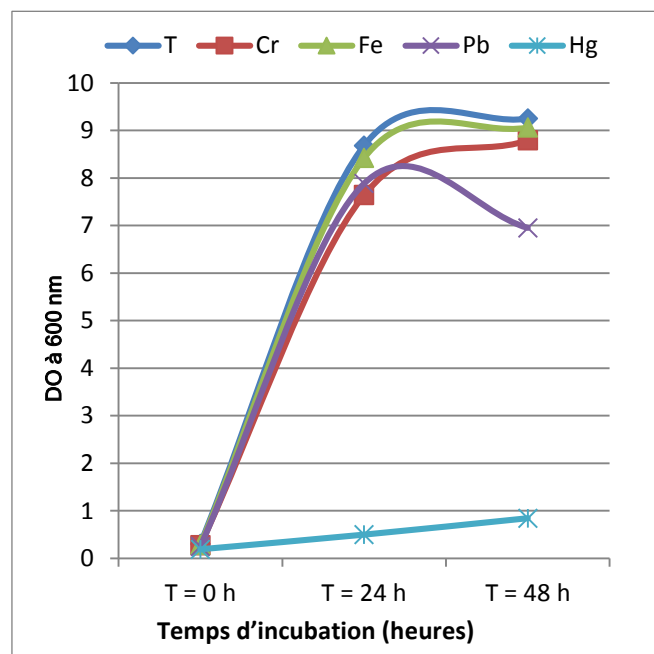


Figure 16. Croissance de souche *Lactobacillus* sp (05) dans le bouillon MRS en présence de 10 mg/l du métal incubée à 37 °C pendant 48 h

D'après ces courbes, la croissance cellulaire des dix souches en présence d'une même concentration (10 mg/l) du métal (Cr, Fe, Pb, Hg) a été comparée avec les témoins montrant la croissance cellulaire des dix souches en absence du métal, nous remarquons qu'au cours du temps d'incubation, il y a une augmentation progressive et continue de la croissance cellulaire avec un taux de croissance rapide durant les premières 24 heures d'incubation en présence de chrome hexavalent, fer et plomb avec une diminution dans les heures suivantes pour les différentes souches, d'une façon que le taux de croissance est presque identique à celui du témoin, à l'inverse, de la croissance en présence du mercure (Hg) où cette dernière est très faible avec un taux de croissance très lent, donc les dix souches montrent une certaine sensibilité à ce métal (Hg). Cette sensibilité est probablement due au fait que le mercure montre une haute affinité au BL que les autres métaux, c'est connu que le mercure est fortement lié aux groupes du thiol de cystéine. De même La croissance cellulaire des BL peut être réduite ou peut être inhibée parce les enzymes du thiol intracellulaire qui sont des enzymes essentielles peuvent être inhibé en présence de mercure Hg (II) (**Kinoshita et al, 2013**). Les travaux de **Akhmetsadykova et al, 2009**, qui ont travaillé sur quatorze des souches de bactéries lactiques isolées du lait ou de *shubat*, ont permis d'observer que les souches étaient capables de croître en présence de fortes concentrations en métaux lourds (plomb et cadmium), ceci a également été constaté par **Halttunen et al, 2007**, qui ont trouvé que certaines bactéries lactiques telles que : *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *B. longum* 2C, *B. longum* 46 et *B. lactis* Bb12 ont la capacité de tolérer la présence de 10 mg/l de cadmium (Cd) et 50 mg/l de plomb (Pb).

De plus, **Kinoshita et al, 2013**, ont étudié l'influence des métaux lourds Cd (II), Pb (II), As(III) et Hg (II) sur la croissance cellulaire de 103 souches de bactéries lactiques à une concentration de 1 ppm pour chaque métal, ils ont trouvé que le mercure Hg (II) a influencé sur la croissance des bactéries et les a même peut inhibé après 48 h alors qu'en présence de Cd (II), Pb (II) et As (III) les différents bactéries lactiques montrent une bonne résistance.

Ces données sont semblables à nos résultats où la croissance de toutes les souches testées est inhibée en présence de Hg (II) (**Figures 7-16**).

Cela suggère que la toxicité du mercure est plus importante que celle des autres métaux lourds. Etant donné que le mercure se lie fortement aux groupements thiol des cystéines ce qui altère la structure des protéines. Dans cette étude, parmi les dix souches bactériennes testées, seulement quatre d'entre elles ont montré une haute résistance aux différents métaux avec un taux de croissance élevé et même une résistance au mercure (Hg) par rapport aux autres souches qui sont (*Lactobacillus* sp (05), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (CHT24), *Lactobacillus* sp (45), *S. salivarius* ssp *thermophilus*

(St.sa)). Ces quatre souches ont été utilisées pour déterminer la souche la plus résistante à des concentrations croissantes en mercure (le métal le plus toxique parmi les quatre métaux lourds).

I.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La tolérance de chaque souche sélectionnée (*Lactobacillus* sp (05), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (CHT24), *Lactobacillus* sp (45), *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa),) au mercure a été évaluée par détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), à partir de laquelle on peut déduire la plus faible concentration du métal dans laquelle aucune croissance cellulaire n'est observée.

Ce test est nécessaire pour déterminer la souche la plus résistante entre elles à ce métal très toxique. Les résultats sont résumés dans le **tableau 07**.

Tableau 07. Valeurs de la densité optique (DO) mesurée à 600nm pour les souches *Lactobacillus* sp (05), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (CHT24), *Lactobacillus* sp (45), *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) avec (Hg)

Souches	St.sa	CHT ₂₄	05	45
Temps [Hg] mg/l	T ₂₄ – T ₀	T ₂₄ – T ₀	T ₂₄ – T ₀	T ₂₄ – T ₀
0	7.997	6.828	6.465	5.574
10	1.403	0.082	0.187	0.050
20	0.183	0.030	0.026	- 0.052
30	0.207	- 0.066	- 0.029	- 0.055
40	0.155	- 0.007	- 0.064	- 0.072
50	0.050	- 0.009	- 0.049	- 0.085
60	- 0.006	- 0.039	- 0.056	- 0.046
70	- 0.029	- 0.037	- 0.017	- 0.042
80	- 0.059	- 0.044	- 0.054	- 0.023
90	- 0.033	- 0.046	- 0.031	- 0.048
100	- 0.040	- 0.058	- 0.030	- 0.057

Les données de ce tableau représentent l'évolution en fonction du temps de la croissance bactérienne des quatre souches *Lactobacillus* sp (05), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (CHT24), *Lactobacillus* sp (45), *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa), en présence de mercure, chaque valeur est déterminée par la différence entre la croissance cellulaire au temps initial (T₀) et après 24 heures (T₂₄) (**Annexes 03, 04, 05, 06**).

Nous résultats montrent clairement que la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée est différente d'une souche à l'autre, La souche bactérienne St.Sa montre un haut degré de résistance au mercure, avec une CMI de 60 mg/l.

La concentration minimale inhibitrice (MIC) des quatre souches (*S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (CHT24), *Lactobacillus* sp (05), *Lactobacillus* sp (45)) dans le milieu MRS qui contient des concentrations croissantes du métal lourd Hg était égale à 30 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l et 60 mg/l, respectivement. Ainsi, l'ordre de la résistance des souches vis-à-vis du mercure est le suivant: *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) > *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (CHT24) = *Lactobacillus* sp (05) > *Lactobacillus* sp (45).

Des résultats similaires ont été trouvés lors d'une étude sur la tolérance des BL au cadmium, qui ont montré que la capacité de résistante au Cd varié considérablement selon les souches des BL testées. Parmi onze souches testées, cinq seulement avaient une résistance remarquable au Cd, y compris deux souches de *L. plantarum* et deux souches de *L. rhamnosus* et une de *B. bifidum*, dont les valeurs de CMI varient de 50 à plus de 500 mg/l, et *L. plantarum* CCFM8610 a montré une valeur de CMI maximale, plus de 1000 mg/l, en comparaison avec les autres souches (Zhai *et al*, 2015). Pareillement, les résultats obtenus par (Bhakta *et al*, 2012) ont montré que la CMI du Cd vis-à-vis de 26 souches de BL varie entre 50 à plus de 1000 mg/l tandis que pour le Pb cette valeur dépasse 2000 mg/l.

La souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) avait une résistance remarquable au mercure (Hg), avec une CMI de plus de 50 mg/l, ce qui indique que cette souche peut survivre facilement dans l'environnement contaminé par des hautes concentrations en mercure, comme dans le tube digestif des êtres humains et animaux à risque d'exposition au mercure (Hg).

Malheureusement, aucune donnée scientifique n'est disponible sur la capacité des lactobacilles ou des bactéries du tube digestif de lier ou d'absorber le mercure. Basés sur ces résultats, nous avons sélectionné la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) pour les autres tests, en raison de sa remarquable tolérance au mercure, pour cela nous avons déterminé la CMI des autres métaux vis-à-vis d'elle (Tableau 08).

Tableau 08. Valeurs de la densité optique (DO) mesurée à 600 nm pour la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) en présence du Pb, Fe, Cr (VI)

Métaux	Plomb	Chrome	Fer
Temps(h) [Me] mg/l	T ₂₄ – T ₀	T ₂₄ – T ₀	T ₂₄ – T ₀
0	6.740	7.494	6.984
10	6.895	6.497	7.297
20	6.900	7.274	6.818
30	6.400	7.394	7.567
40	6.655	8.667	7.268
50	6.385	7.104	6.932
60	6.552	7.139	7.496
70	6.677	6.873	6.492
80	6.501	7.535	7.178
90	6.642	7.362	7.252
100	6.773	7.495	5.880
110	6.288	7.422	5.225
120	6.235	7.550	4.679
130	6.203	7.620	3.640
140	6.468	7.349	2.769
150	6.249	6.956	1.856
160	6.149	6.527	1.586
170	6.042	7.258	1.033
180	5.823	7.002	0.492
190	5.592	6.898	- 0.112
200	4.100	6.898	- 0.035
250	1.993	2.024	- 0.084
300	- 0.027	0.757	- 0.173
350	- 0.089	0.102	- 0.178
400	- 0.166	-0.406	- 0.233
450	- 0.260	-0.142	- 0.300
500	- 0.244	-0.229	- 0.282

A partir des résultats (**Tableau 8**), on signalera que la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) a un haut degré de résistance aux trois métaux lourds testés, notamment au Pb (II) et au Cr (VI), dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) dans le milieu liquide (bouillon MRS) est différente selon les ions du métal lourds additionné. On remarque que la plus faible concentration pour le Cr (VI) dans laquelle aucune croissance de la souche *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.Sa) n'a pu être observée est égale à 400 mg/l, alors que pour le plomb la CMI est égale à 300 mg/l, d'autre part, la plus faible concentration pour le fer dans laquelle aucune croissance bactérienne n'a pu être observée est égale à 190 mg/l.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du Cr (VI), du Fe et du Pb est nécessaire pour l'étude de la croissance microbienne de la souche sélectionnée en présence de chaque métal, en se basant sur les résultats des **Tableau 7** et **Tableau 8** nous pouvons remarquer que les métaux lourds testés sont différents dans leurs effets inhibiteurs vis-à-vis la souche sélectionnée. La classification des effets inhibiteurs des quatre ions de métal lourds sur la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) est dans l'ordre suivant : Hg (II) > Fe(II) > Pb (III) > Cr (VI). Cette classification peut traduire le degré de sensibilité de notre souche aux métaux, donc elle est très sensible au mercure mais présente une bonne résistance au chrome hexavalent. Par ailleurs, nous avons remarqué que la croissance cellulaire de la souche est décroissante en fonction de la concentration du métal. Ceci est, autrement dû à l'effet inhibiteur exercé par les ions métalliques présents. Ainsi, et suivant ces résultats, nous avons choisi de travailler avec le chrome (VI) en raison de la haute résistance de la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) pour ce métal, ce qui indique sa capacité prometteuse pour une éventuelle application en désintoxication de métal.

I.3. Influence du chrome hexavalent sur la croissance de la souche *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa)

Plusieurs études antérieures ont rapporté l'effet de la biomasse existante sur la résistance des bactéries aux métaux lourds, notamment l'effet de la variation de la densité de la biomasse bactérienne et le pH du milieu (**Bhattacharya et Gupta, 2013; Kinoshita et al, 2013; Soni et al, 2013**). Cependant, nous avons concentré dans notre étude sur l'effet de la concentration initiale en chrome hexavalent sur la capacité de résistance de notre souche en démarrant avec une même densité en biomasse (2 %). Dans ce test nous avons évalué l'effet de la présence de différentes concentrations en Cr (VI) allant de 10 mg/l jusqu'à 500 mg/l sur l'allure générale des courbes de croissance de la souche, par la mesure de la DO à 600 nm, et en comparaison avec le témoin qui ne contient pas le Cr. Les résultats sont illustrés dans la **Figure 17**.

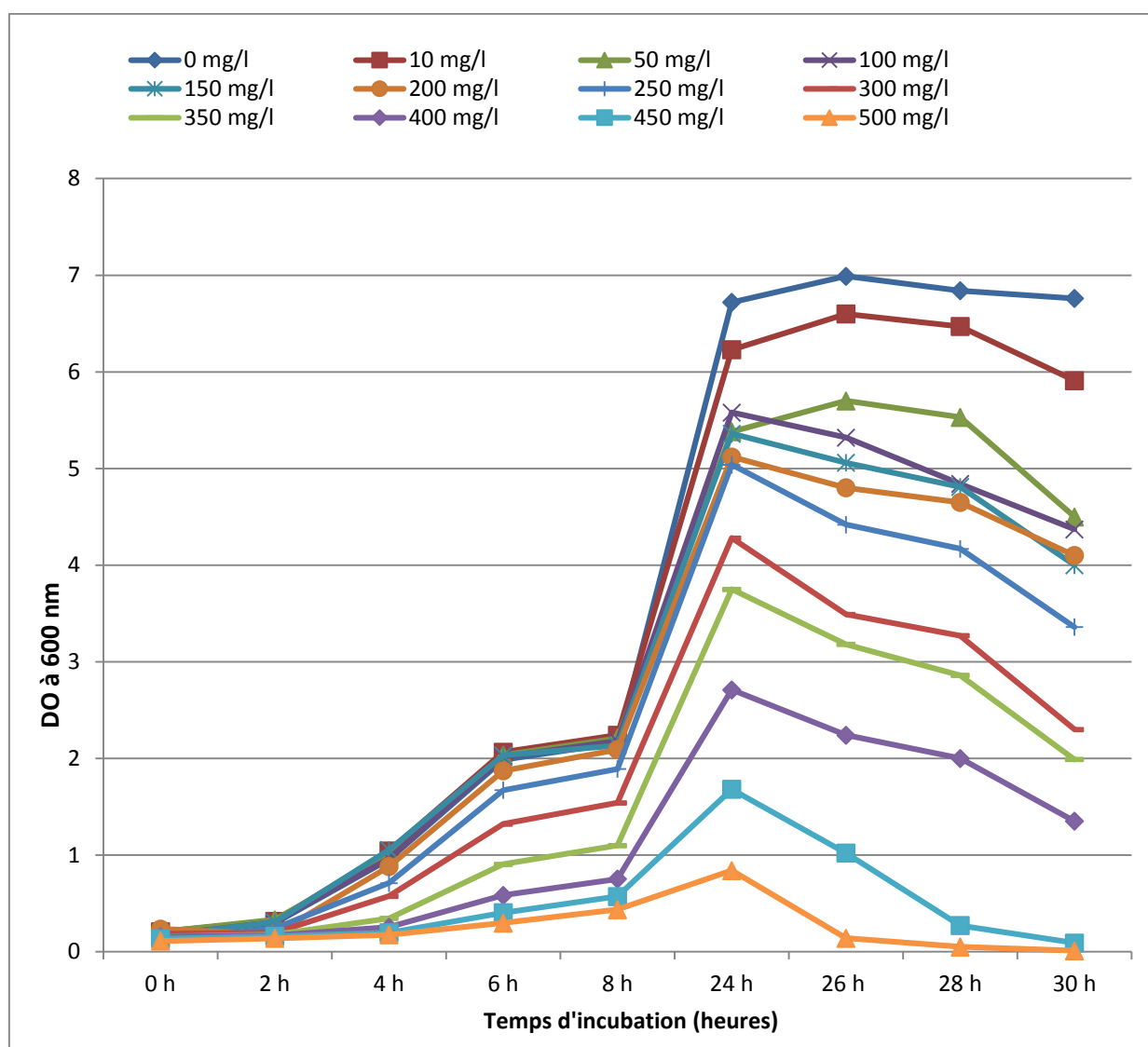


Figure 17. Cinétique de croissance de *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) en présence de différentes concentrations en Cr (VI) dans le bouillon MRS à 37 °C

Les résultats montrés dans la **figure 17** montrent que la concentration du chrome hexavalent influence considérablement sur la croissance de la souche bactérienne notamment à des hautes concentrations. Il est clair que durant les premières heures d'incubation correspondant à la phase de latence, la croissance de la souche est faible et relativement stable durant les deux premières heures d'incubation, de plus la croissance est presque la même en absence et en présence des concentrations faibles du métal allant jusqu'à 200 mg/L, toutefois après 24 h, on remarque une différence dans la croissance d'une concentration à l'autre qui diminue au cours du temps d'incubation par rapport au témoin. Tandis que les concentrations allant de 250 mg/L jusqu'à 500 mg/L, montrent clairement une inhibition de la croissance en en fonction de l'augmentation de la concentration initiale du Cr(VI) dès les premières heures d'incubation, notamment à des

concentrations plus élevées en chrome dépassant les 250 mg/L, où on peut remarquer une inhibition totale de la croissance bactérienne après 28 h d'incubation à la concentration de 450 mg/l et après 26 h d'incubation à la concentration de 500 mg/l.

En absence de données sur l'influence des ions chromate sur les BL, on se trouve dans l'obligation de comparer nos résultats avec ceux des bactéries saprophytes, c'est le cas des résultats de **Soni et al, 2013** qui ont travaillé sur quatre souches *Bacillus* sp. (JN674188), *Microbacterium* sp. (JN674183), *Bacillus thuringiensis* (JN674184), et *Bacillus subtilis* (JN674195), ils ont montré que la croissance bactérienne a été affectée par l'augmentation de la concentration en Cr(VI) dans un intervalle de (0.2-1.0 mM).

De même, **Xu et al, 2015** ont démontré que l'effet toxique du Cr(VI) sur la croissance cellulaire de la souche *Bacillus anthracis* augmente avec l'augmentation de la concentration du Cr(VI), ils ont remarqué une variation de la morphologie cellulaire suivie d'une inhibition de la croissance en présence de 125 mg/l de Cr(VI).

I.4. Etude des interactions du chrome avec la souche lactique *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa)

Ce test nous permet d'une part, de suivre la variation de la concentration du chrome (IV) dans le milieu extracellulaire et d'autre part, la mesure de la quantité de Cr (IV) accumulée par les cellules (test de bioaccumulation). De plus, l'effet des conditions abiotiques sur le Cr (VI) et la capacité des cellules mortes à adsorber le métal ont également testés.

I.4.1. Variations de chrome (VI) extracellulaire dans le milieu de culture

Ce test nous permet d'évaluer l'aptitude de la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* à éliminer le Cr (VI) dans le bouillon MRS, en présence d'une concentration initiale de 50 mg/l, Parallèlement, un témoin, ne contenant que le Cr(VI) a été préparé et incubé dans les mêmes conditions abiotiques (oxygène) sur la réduction du chrome hexavalent. Une biomasse lactique morte a été également testée pour sa capacité à adsorber le métal dans les mêmes conditions. La réduction de chrome (VI) est suivie par la mesure de l'évolution de sa concentration dans le milieu de culture toutes les 24h pendant 72h (T₀, T₂₄, T₄₈, T₇₂).

En parallèle la croissance cellulaire de la souche (St.sa) dans le milieu de culture en absence et en présence du Cr (VI) à 50 mg/l est suivie par la mesure de la DO à 600 nm, tout au long du test (**Figure 18**). Le pourcentage de réduction du Cr (VI) par la souche est calculé pour les temps T₀, T₂₄, T₄₈ et T₇₂ (**Figure 19**).

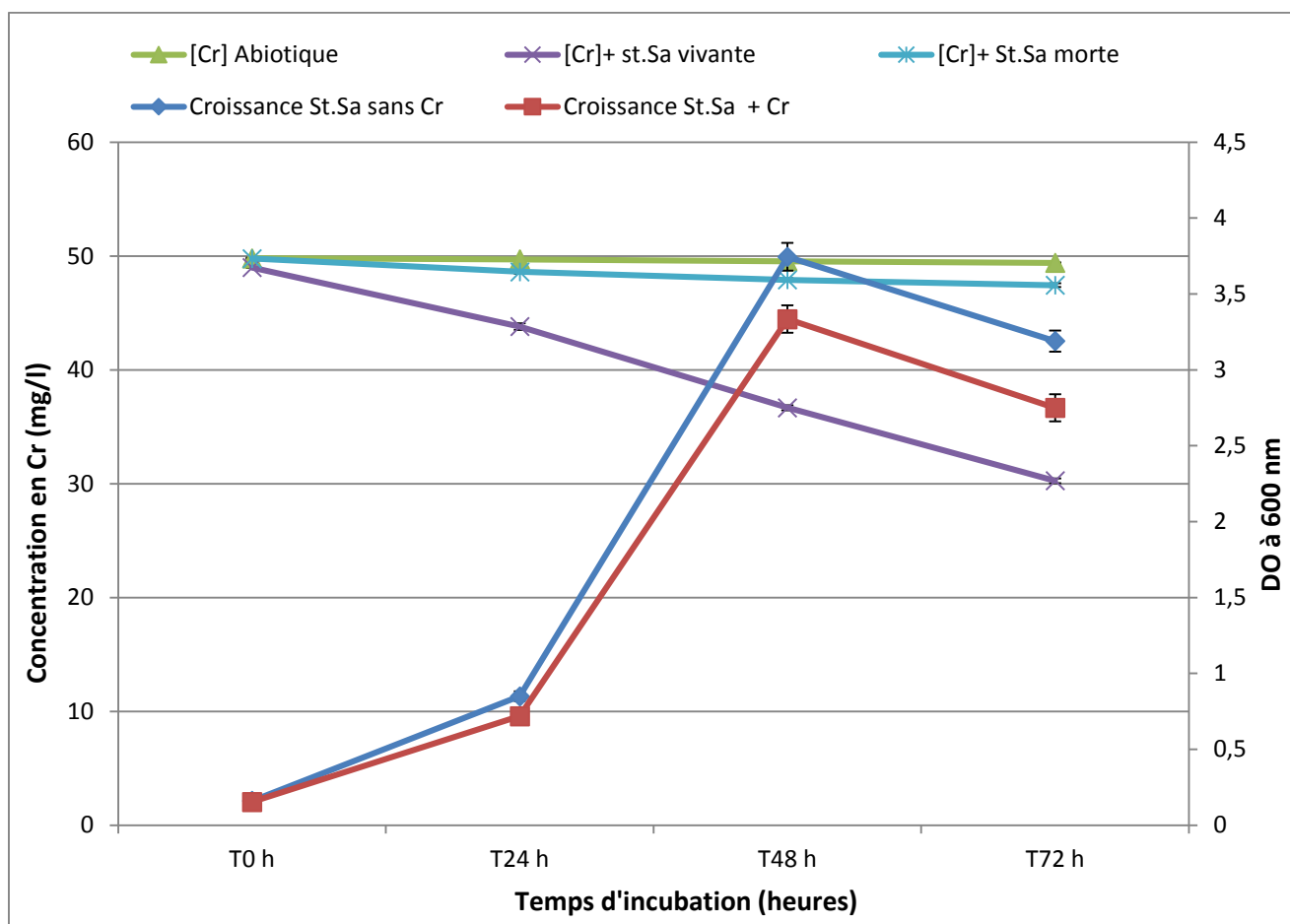


Figure 18. Evolution de la concentration du Cr (VI) en (mg/l) et la croissance de St.sa dans le bouillon MRS en fonction du temps et en présence d'une concentration initiale en Cr de 50 mg/l (Valeurs de la moyenne (\pm SE)).

D'après la **Figure 18**, qui est une représentation graphique des résultats de la réduction du Cr(VI) en mg/l, en fonction du temps. Nous constatons que pour une concentration initiale de 50 mg/l du chrome (VI), la capacité de réduction du Cr (VI) pendant les 72 heures, dans le témoin (contrôle abiotique) est très faible voire inexistante, c'est-à-dire que l'effet des conditions extérieures est négligeable, cependant dans le milieu contenant la biomasse morte, le niveau de réduction est très faible, cependant une diminution du taux de Cr (VI) relativement faible en fonction du temps d'incubation est enregistrée, cela peut être dû à l'adsorption physique qui a eu lieu étant donné que la souche est riche en polysaccharides de surface (**Schut et al, 2011**).

Priya et al, 2013, ont montré que la biosorption du chrome hexavalent par les biomasses mortes des bactéries, des algues, des moisissures et des levures est dû aux interactions électrostatiques entre les ions du métal dans le milieu de culture et les parois cellulaires microbiennes. Quant au milieu contenant la biomasse vivante, nous remarquons une vitesse d'élimination très lente dans les

premières 24 heures [$T_0 - T_{24}$], de même la cinétique de croissance bactérienne en absence et en présence de chrome hexavalent est lente durant cette période, puis lorsque les cellules bactériennes entrent dans la seconde phase, correspond à la phase exponentielle, un accroissement de la capacité de réduction est nettement perceptible à partir de 24 h d'incubation, et elle atteint le maximum de réduction de Cr (VI) après T_{72} , où la croissance bactérienne de St.Sa est d'autant plus importante. Ces résultats indiquent qu'il existe une relation entre le dynamisme de réduction du Cr (VI) et la croissance bactérienne (**Patra et al, 2010**). La croissance des cellules stimule une réduction efficace du Cr (VI) et en revanche sa diminution dans le milieu favorise la croissance bactérienne, de ce fait, on remarque que cette dernière est similaire à la croissance cellulaire en absence du chrome (VI). Cela peut être expliqué par le fait que notre bactérie a une résistance au Cr (VI), qui résulte probablement, du transport du métal lourd à travers les membranes cellulaires microbiennes qui servent de médiateur par le même mécanisme de transport des ions métaboliquement importants tels que le potassium, le magnésium et le sodium. Les systèmes de transport des métaux peuvent être confondus par la présence d'ions du métal lourds de la même charge et même rayon ionique que les ions essentiels. Ce genre de mécanismes n'est pas associé à une activité métabolique (**Priya et al, 2013**).

Selon **Kinoshita et al, 2013**, les métallothioneines (MTs) sont des protéines riches en cystéine qui ont la capacité de se lier aux métaux lourds, ces protéines maintiennent l'homéostasie intracellulaire des ions et contribuent à la désintoxication des ions du métal lourd. De même, **Halttunen et al, 2007** ont rapporté que les échanges ioniques à travers les surfaces peuvent être impliqués dans la bioaccumulation des métaux lourds.

D'autre part, **Schut et al, 2011**, ont examiné la capacité d'accumuler le cuivre par huit espèce de *Lactobacillus* typiques de la vigne dans deux états physiologiques des bactéries: vivantes (bactéries activées) et mortes (bactéries désactivées), après traitement par la chaleur, ils ont constaté, un degré considérable d'adsorption du Cu(II) par les bactéries mortes, cependant, l'adsorption du cuivre par les cellules mortes était plus faible par rapport à la biosorption par les cellules vivantes. La réduction du chrome par la biomasse vivante comprend principalement deux états : la première, est indépendante du métabolisme bactérien et comprend l'adsorption où les ions du chrome sont liés aux parois cellulaires, la deuxième, est dépendante du métabolisme par laquelle les ions du chrome sont transportés à travers la membrane cellulaire « bioaccumulation ».

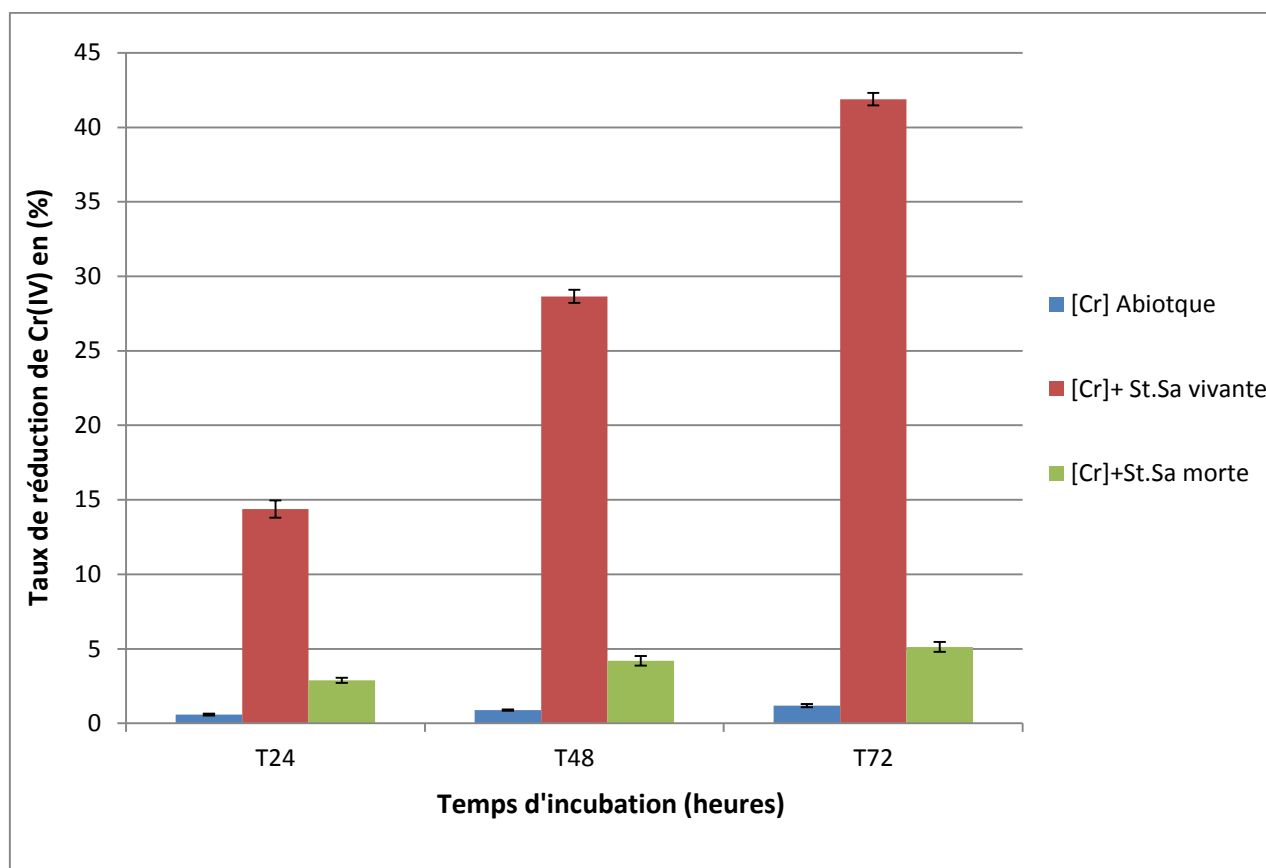


Figure 19. Variation du pourcentage d'élimination du Cr (VI) par la souche *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) en fonction du temps (Valeurs de la moyenne (\pm SE)).

La **Figure 19** présente le taux de réduction du chrome hexavalent dans le bouillon MRS au cours du temps, les résultats obtenus ont montré que la concentration extracellulaire en Cr(VI) est diminuée notamment dans le milieu avec la souche vivante où le taux de réduction est très élevé et atteint le maximum 41.89 ± 0.41 (%) après 72 h, alors qu'avec la biomasse morte le pourcentage de réduction est faible où son maximum est de 5.13 ± 0.32 (%) et tous les échantillons ont montré une différence considérable par rapport au milieu abiotique, qui ne contient pas de cellules bactériennes où le pourcentage de réduction est de 1.19 ± 0.09 (%) après 72 h d'incubation.

Concernant le taux de réduction du Cr(VI), **Patra et al, 2010** ont rapporté que le taux de réduction du Cr(VI) pour trois souches à Gram positif *Arthrobacter*, *Bacillus* et *Rhodococcus*, était faible et presque stable pendant les premières heures d'incubation [T_0 - T_{20}] puis une réduction remarquable a été enregistrée au cours du temps jusqu'à une élimination totale du Cr après 75 h d'incubation.

Nous tenons à signaler, que les données relatives à l'élimination du Cr (VI) par les BL sont inexistantes, ce qui ne nous permet pas de comparer nos résultats à d'autres.

I.4.2. Bioaccumulation du chrome (VI) par la culture bactérienne

Ce test nous a permis d'évaluer la capacité de *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) à accumuler le Cr (VI) après 72h d'incubation à 37°C sous agitation, en présence d'une concentration initiale de 50 mg/L en Cr (VI), en comparant avec le test témoin constitué d'une culture dans les mêmes conditions mais en absence de métal. Les résultats du test sont présentés ci-dessous dans la **Figure 20**.

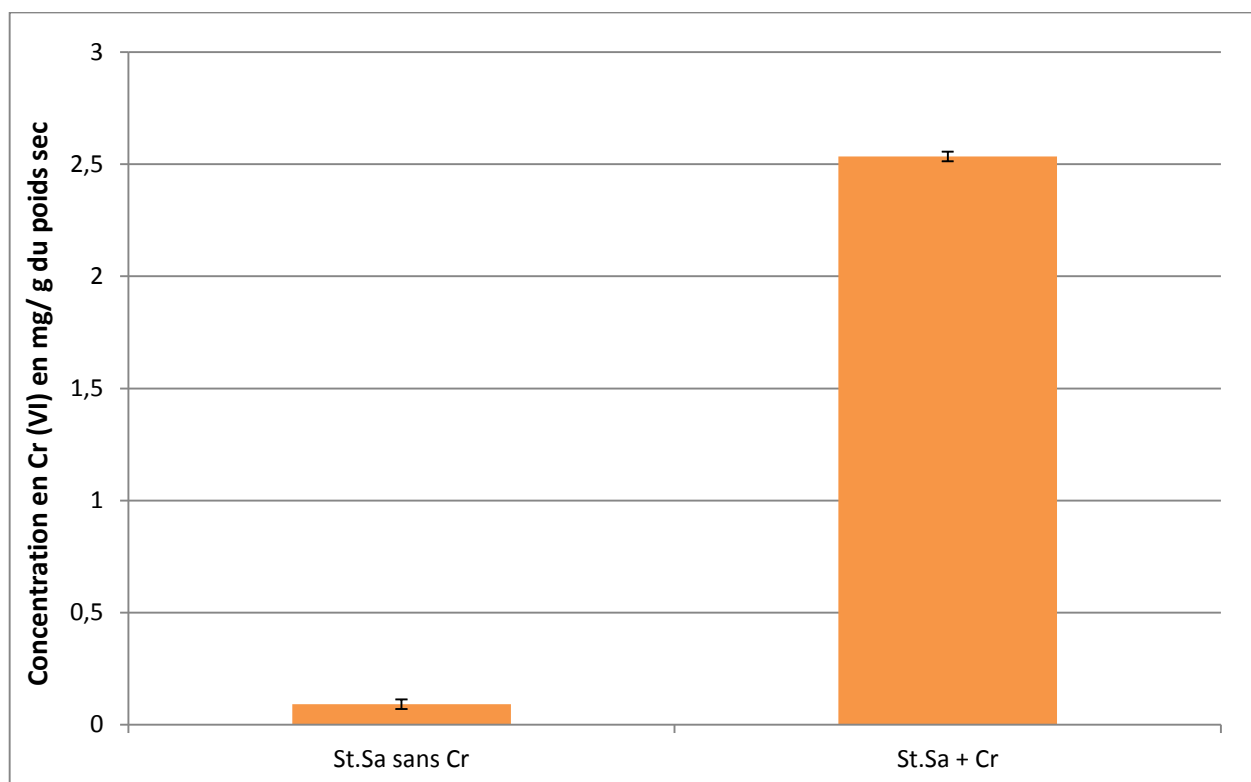


Figure 20. Bioaccumulation du Cr par St.sa en présence de 50 mg/L de dans le bouillon MRS après 72h d'incubation à 37 °C (Valeurs de la moyenne (\pm SE))

Le dosage par la méthode colorimétrique du Cr (VI) intracellulaire dans la souche bactérienne a donné les résultats présentés dans la figure ci-dessus. Cette figure montre qu'il y a une différence remarquable dans la concentration intracellulaire du Cr (VI) pour la bactérie cultivée dans un milieu dépourvu de métal et l'autre cultivée en présence d'une concentration initiale de 50 mg/l en Cr (VI), où elle atteint 2.53 ± 0.16 mg de Cr(VI) / g du poids sec de la biomasse, cependant sa concentration en absence du métal est de 0.091 ± 0.021 mg de Cr(VI) / g du poids sec. Ces résultats permettent de confirmer la capacité de notre souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) à accumuler le chrome hexavalent. Peu de travaux qui s'intéressent à la bioaccumulation des métaux lourds par les BL sont disponibles. Toutefois, **Bhakta et al, 2012**, étudient soixante-quatre souches de BL isolées de la

boue activée et qui montrent une efficacité, d'accumuler le Cd(II) et le Pb (II), ils ont rapporté que le taux d'accumulation des métaux par *Enterococcus faecium* Pb12 était égale à 0.0377 mg Cd/h/g et 0.0460 mg Pb/h/g de biomasse humide pour le cadmium et le plomb, respectivement. De même **Chang et al, 2012**, ont montré que *Lactobacillus reuteri* Cd70-13 et Pb71-1 a montré une haute capacité de réduction du Cd (II) (25%) et Pb (II) (59%) du milieu de culture (MRS). Dans une autre étude, **Halttunen et al, 2007**, ont indiqué l'existence d'interactions électrostatiques entre les métaux lourds et les BL, ils ont suggéré que l'élimination rapide du Cd(II) et du Pb (II) par les BL et les *bifidobactéries* est due à l'incorporation passive des métaux à la surface des bactéries plutôt que par accumulation à l'intérieur de la cellule. Par ailleurs, **Halttunen et al, 2008**, ont remarqué une corrélation négative entre l'élimination des différents métaux lourds qui est probablement le résultat de la diversité des mécanismes d'« élimination- bioaccumulation » et des propriétés physiologiques des souches testées.

D'après les résultats cités précédemment dans cette étude, il apparaît clairement que la souche testée *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) est capable de résister et de croître en présence du chrome hexavalent comme elle a le pouvoir de l'éliminer soit par adsorption sur la paroi cellulaire ou principalement par bioaccumulation intracellulaire. Cela peut nous permettre de suggérer qu'il y a une affinité entre les ions du chrome hexavalent et les cellules bactériennes, celui-ci pourra être accumulé par divers mécanismes notamment la formation d'un complexe de métaux dans des systèmes biologiques qui comprennent l'accumulation dans les carbohydrates, les complexes protéiques polyphosphates ou une complexation avec les groupements carboxyle du peptidoglycane de la paroi cellulaire (**Kinoshita et al, 2013**).

I.5. Evaluation des aptitudes probiotiques de la BL *in vitro*

L'acidité dans l'estomac et les fortes concentrations en sels biliaires dans l'intestin sont deux barrières puissantes qui influencent le contrôle et le maintien du microbiote de tube digestif et qui préviennent la croissance et la survie des probiotiques (**Zhai et al, 2015**). En effet, une éventuelle application de notre souche lactique en désintoxication du chrome hexavalent dans le tube digestif devrait être précédée par une évaluation de ces propriétés probiotiques notamment son taux de survie dans les conditions du tractus gastrointestinal.

I.5.1. Evaluation du taux de survie de la BL aux conditions acides

La résistance aux différents pHs est l'un des indicateurs de la capacité des bactéries de survivre et de croître dans le tractus intestinal, elle représente donc, une condition préalable pour les probiotiques (**Ehrmann et al, 2002**). Bien que le stress cellulaire commence dans l'estomac, qui a un pH aussi faible que 1.5, la plupart des essais *in vitro* sont réalisés à pH 3.0. Ainsi, l'examen

préalable de toutes les cultures étudiées pour leur tolérance à faible pH 2.0 et à pH 6.4 neutre est exigé. En outre, plusieurs études indiquent que les bactéries ne survivent pas en nombre suffisant au cours de leur passage dans le tractus gastro-intestinal (**Khater et al, 2010**).

Dans un premier lieu, la souche *S. salivarius ssp thermophilus* a été incubée à pH acide (pH2, pH3) et à pH neutre (pH6.4) en vue de comparer la tolérance des cellules dans les deux états aux conditions similaires à celles de l'estomac. Les résultats de la croissance de la souche bactérienne sur milieu acide et neutre sont représentés dans le **tableau 09**

Tableau 09. Croissance de la souche *S. salivarius ssp thermophilus* en fonction du pH du milieu

pH du milieu Temps	Nombre de cellules /ml		
	pH2	pH3	pH6.4
T 0 h	31 x 10 ⁴	27 x 10 ⁴	28 x 10 ⁴
T 2 h	32 x 10 ⁴	35 x 10 ⁴	86 x 10 ⁴
T 4h	22 x 10 ⁴	37 x 10 ⁴	103 x 10 ⁴

D'une part, on remarque que les cellules montrent une bonne tolérance aux conditions acides, la croissance cellulaire a lieu dans les différents pH (pH2, pH3 et pH6.4), après deux heures d'incubation, le nombre de cellules atteint 32.10⁴ cellules/ml, 35.10⁴ cellules/ml et 86.10⁴ cellules/ml, respectivement, cependant, après 4 heures d'incubation, la croissance cellulaire diminue légèrement dans le milieu à pH2 et atteint environ 22.10⁴ cellules/ml, tandis que, cette dernière est poursuivie à pH3 mais avec une vitesse de croissance faible 37.10⁴ cellules/ml, par rapport, à pH 6.4 avec une croissance rapide de 103.10⁴ cellules/ml, ces résultats peuvent traduire la capacité de la souche *S. salivarius ssp thermophilus* à résister aux conditions acides. A partir des résultats du tableau 17 nous pouvons calculer le taux de survie, selon **Lee et al, (2016)** :

$$\text{Taux de survie \% (SR)} = \frac{\text{Nombre des cellules viables soumises au stress dans MRS}}{\text{Nombre des cellules viables dans le MRS contrôle.}} \times 100$$

A partir du **tableau 10** nous remarquons que la souche *S. salivarius ssp thermophilus* montre une résistance aux acides (la survie à différentes valeurs de pH), on note une tolérance remarquable au pH 3 avec un taux de survie de 35.92 % après une période d'incubation de 4 h à pH 3 a été notée, alors qu'à pH 2 le taux de survie est de 21.35 %.

Tableau 10. Taux de survie (%) de la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* dans le milieu acide

Temps	Taux de survie (%)	
	pH 3	pH 2
T0 h	100	100
T2 h	40.69	37.20
T4 h	35.92	21.35

Ces résultats s'avèrent moyens par rapport à ceux des autres auteurs qui ont testé la viabilité des bactéries probiotiques dans des conditions similaires à l'acidité de l'estomac et de l'intestin, parmi lesquels citons l'étude réalisée par **Zhai et al, (2015)** portant sur onze souches dont *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum* CCFM16 et *L. rhamnosus* CCFM311 et qui ont montré une résistance importante aux acides de l'estomac après 3 heures d'incubation avec des taux de survies qui atteignent 93.36% , 91.93% et 91.14 % , respectivement, cependant, avec les conditions similaires à celles de l'intestin, *B. bifidum* CCFM8622, *L. casei* CCFM30 et *L. plantarum* CCFM309 ont présenté des taux de survie de 94.82%, 93.98% et 92.98%, respectivement. De la même manière, **Ehrmann et al, (2002)**, ont rapporté la capacité de résistance des souches *L. reuteri* TMW 1.979, *L. reuteri* TMW 1.974, *L. salivarius* TMW 1.970, *L. animalis* TMW 1.972 et *L. salivarius* TMW 1.992, dans les pH 2 et 3, et notamment les deux souches *L. salivarius* TMW 1.992 et *L. animalis* TMW1.972 qui peuvent survivre dans un milieu très acide à pH 1.

Ainsi, **El Jeni et al, (2015)**, ont signalé la résistance des quatre souches de bactéries lactiques *Enterobacter faecium* HG937695, *E. faecium* HG937696, *E. faecium* HG937697 et *Leuconostoc mesenteroides* HG937700 dans des conditions de faible pH (pH2, 3 et 4) *in vitro* avec une bonne viabilité bactérienne après 3 heures d'exposition. Des résultats similaires ont été rapportés par **Kacem et Karam (2006)**, pour onze souches de *L. plantarum* qui ont montré une bonne survie à pH2 et pH3 après six heures d'incubation, parmi elles, les deux souches *L. plantarum* OL12 et *L. plantarum* OL15 montrent un taux de survie de 26 ± 1.7 et 28 ± 1.4 % à pH2 et 73 ± 1.2 , 52 ± 2.1 à pH3, respectivement, cependant à pH1 aucune souche n'a pu survivre.

D'une manière générale, les résultats de notre travail ont permis de confirmer qu'il y a une croissance aussi bien qu'une viabilité acceptable de *S. salivarius* ssp *thermophilus* avec un taux de survie moyen en milieu acide.

I.5.2. Evaluation du taux de survie de la BL aux sels biliaires

La bile est la seconde barrière à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site d'action, elle a une fonction détergente (émulsifie et dégrade les lipides) ce qui lui confère une forte activité antimicrobienne, principalement due à la dissolution des membranes bactériennes (**Bergley et al, 2006**).

De ce fait, la tolérance de la souche probiotique, *S. salivarius ssp thermophilus* aux sels biliaires à pH 6.4 a été évaluée pour simuler les conditions du tube digestif. Pour garantir la tolérance des cellules à la bile, il est nécessaire d'utiliser un inoculum faible (0.5%, v/v) pour avoir une valeur de DO_{560nm} initiale faible et pour assurer que la culture est dans une phase exponentielle précoce de sa croissance. Les courbes de la **figure 21** représentent la croissance cellulaire mesurée (DO_{560nm}) pour *S. salivarius ssp thermophilus* après l'exposition à 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.3% de sels biliaires pendant 8h, respectivement, et les résultats du retardement de la croissance (D) sur les différents milieux MRSO sont représentés dans le **tableau 11**.

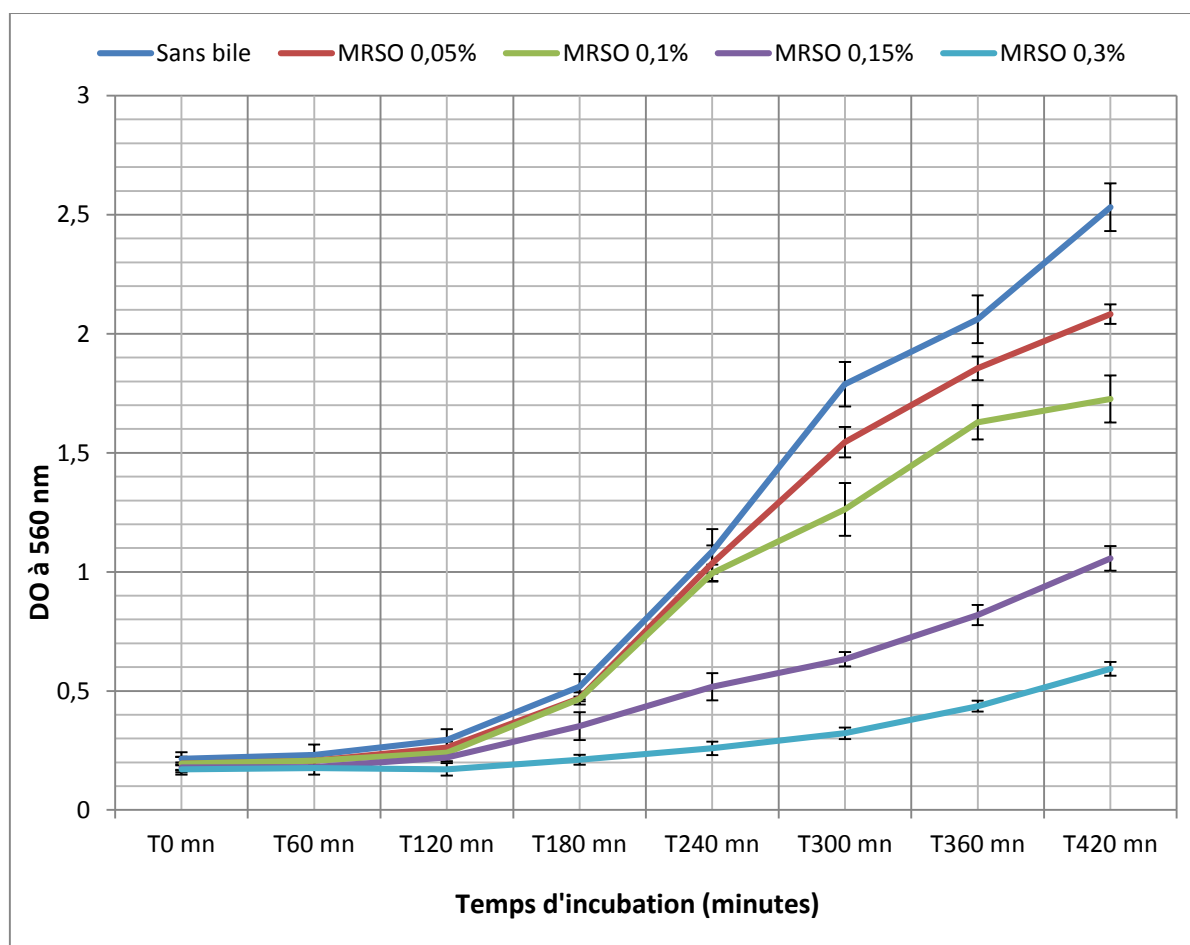


Figure 21. Croissance de la souche *S. salivarius ssp thermophilus* incubée dans le bouillon MRS additionné de sels biliaires

D'après les résultats illustrés dans la **figure 21**, nous remarquons une croissance cellulaire faible de *S. salivarius ssp thermophilus* après incubation des cellules pendant 3 heures dans les sels biliaries à concentrations élevées (0.15%, 0.3%), en comparaison avec le témoin qui ne contient pas de sels biliaries, cela peut être traduit par une diminution de la viabilité des cellules, tandis qu'après 4 heures d'incubation, on remarque une augmentation légèrement faible qui continue jusqu'à 7 heures d'incubation, cela peut se justifier par le fait que la souche a développé une résistance à ce stress. Alors que pour les cellules incubées dans les milieux MRS avec des concentrations faibles en sels biliaries (0.05%, 0.1%), ces dernières montrent qu'il y a une croissance remarquable de la souche sur ces milieux, avec une vitesse de croissance presque identique à celle du témoin dans les premières heures d'incubation, mais après 4 heures d'incubation il est clair que la croissance de *S. salivarius ssp thermophilus* sur les milieux en présence des sels biliaries diminue avec le temps d'incubation par rapport au témoin.

Tableau 11. Retardement de la croissance de *S. salivarius ssp thermophilus* en présence des sels biliaries

Milieux de cultures	Temps d'incubation		Retardement de la croissance (T ₂ -T ₁)	
	DO = 0.5	DO = 1.5	D à DO = 0.5	D à DO = 1.5
MRS sans bile	180 mn	270 mn		
MRSO : 0.05 %	180 mn	300 mn	0 mn	30 mn
MRSO : 0.1 %	180 mn	330 mn	0 mn	60 mn
MRSO : 0.15 %	240 mn	-	60 mn	-
MRSO : 0.3 %	390 mn	-	210 mn	-

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent clairement qu'il y a une nette différence dans le décalage de la croissance entre les différents MRSO. Nous avons constaté que le temps de retardement augmente lorsque les concentrations des sels biliaries sont élevées. En se basant sur nos résultats obtenus, nous avons déduit que la souche *S. salivarius ssp thermophilus* (St.sa) est deux fois plus résistante à une exposition pendant 7h dans les concentrations faibles en sels biliaries (0.05 %, 0.1 %) que dans les concentrations élevées (0.15 %, 0.3 %). Pareillement, des niveaux de résistance aux sels biliaries semblables ont été rapportés pour d'autres lactobacilles, en effet, **Lee et al, (2016)**, ont montré que *Lb. plantarum* C182, *Leuconostoc mesenteroides* C10, *L. mesenteroides* F27 et *L. mesenteroides* C4 sont capables de résister et de survivre après 3 h d'exposition à une concentration de 0.3% en sels biliaries.

De plus, **Benavides et al, (2016)**, ont rapporté une haute résistance aux sels biliaires de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* et *Lactobacillus pentosus* après 4 heures d'exposition à une concentration de 0.3 % de la bile.

I.5.3. Aptitude antagoniste de *S. salivarius* ssp *thermophilus*

Ce test a pour but l'évaluation de la capacité de la souche lactique sélectionnée à inhiber la croissance de quelques souches de référence. Les résultats relatifs à ce test sont présentés dans le **tableau12**.

Tableau 12. Pouvoir antagoniste de la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* envers quelques souches référence

Souche pathogène	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	11	0	9	7

Après la mise en contact du surnageant de la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* avec les souches de référence, nous remarquons l'absence d'une zone d'inhibition avec *Pseudomonas aeruginosa* ce qui traduit l'absence de produits inhibiteurs, en revanche, l'apparition de zones d'inhibition autour des disques avec les autres souches *Staphylococcus aureus* (11mm), *Klebsiella pneumoniae* (9mm) et *Escherichia coli* (7 mm), montre qu'il y a une activité antagonistique de notre souche lactique vis-à-vis de ces dernières, avec la capacité de production de substances inhibitrices. Le pouvoir d'inhibition de la souche pathogène *Staphylococcus aureus* est le plus important. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par plusieurs auteurs comme **Labioui, (2005)** qui a trouvé que la souche BLh5 du genre *Streptococcus* présente une activité bactéricide importante sur *Escherichia coli* ATCC 25921, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Klebsiella pneumoniae*. D'après les résultats de ces essais, nous pouvons adopter le terme « probiotique » pour désigner la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus*, toutefois, une étude plus approfondie des divers mécanismes impliqués dans le pouvoir antagoniste est nécessaire.

A l'issue de cette étude, nous pouvons constater que la souche lactique *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* testée a montré une grande capacité à réduire le chrome hexavalent, ce qui nous permet de postuler que l'ingestion des BL ayant cette même caractéristique peut prévenir l'absorption de l'ion chromate dans l'organisme, ce qui facilitera son expulsion par défécation.

Néanmoins, une telle suggestion ne peut être validée qu'après avoir réalisé plus d'analyses *in vitro* et *in vivo* afin de mieux comprendre les mécanismes qui y sont impliqués. L'un des tests proposés, est l'évaluation de l'affinité des ions chromate aux cellules épithéliales du tube digestif.

Conclusion

Conclusion

Cette étude a pour objectif l'étude de la bioaccumulation des métaux lourds par les souches de BL. Dans la première partie expérimentale, nous avons étudié la capacité de résistance des souches aux quatre métaux (Pb, Hg, Cr, Fe). Dans la deuxième partie nous avons évalué l'aptitude d'élimination et de bioaccumulation du Cr(VI) par la souche lactique *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa).

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que:

- ❖ La résistance aux métaux a été observée pour les dix souches de BL isolées de différentes origines soumises à une même concentration initiale de l'ion métallique des quatre métaux lourds testés (Pb, Hg, Cr(VI), Fe).
- ❖ L'analyse et la comparaison de la résistance aux métaux lourds sur les différentes souches a permis de mettre en évidence une résistance remarquable de la souche St.sa pour ces métaux et notamment pour le chrome hexavalent.
- ❖ La survie et la croissance cellulaire *in vitro* du *S. salivarius* ssp *thermophilus* ne sont pas affectées par les teneurs croissantes en chrome (VI), de même la mesure de la concentration minimale inhibitrice montre une haute résistance avec une CMI de 400 mg/l.
- ❖ L'élimination du chrome (VI) par le processus de bioaccumulation par la souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) a été confirmée en mettant en œuvre son analyse par la méthode colorimétrique par le 1,5 diphénylcarbazide.
- ❖ La souche *S. salivarius* ssp *thermophilus* a montré une résistance relativement élevée aux conditions du tube digestif, notamment, le pH acide et les sels biliaires. En outre, une activité antagoniste faible a été notée à l'égard des souches pathogènes testées.
- ❖ Aux propriétés probiotiques que montrent cette souche, s'ajoute une remarquable capacité à accumuler le chrome hexavalent ou même d'autres ions métalliques, ce qui laisse suggérer que la consommation des bactéries probiotiques en quantités suffisantes contribue à la désintoxication de ces éléments toxiques.

Il est important de signaler que cette étude préliminaire a permis de démontrer la capacité des BL probiotiques à tolérer des concentrations très élevées en métaux lourds, ce qui laisse postuler qu'un rôle dans la désintoxication de ces polluants s'ajoute aux divers rôles bénéfiques que fournit cette remarquable famille de microorganismes.

Finally, this work leaves also open questions and perspectives on studies to pursue to answer, as is the case of the need to carry out genetic and molecular studies to deepen knowledge on the mechanisms at play with these probiotic strains in the elimination of metals, and our last perspective, concerns the application of this approach in various fermented food products, particularly, dairy products.

Références bibliographiques

A

Abbaszadeh S, Tavakoli R, Sharifzadeh A et Shokri S. 2015. Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Journal de Mycologie Médicale* 25 : 263—267.

Akhmetsadykova S, Loiseau G, Faye B et Konuspayeva G. 2009. Interaction du plomb et du cadmium avec les bactéries lactiques du lait de chamelle cru et fermenté Interaction of lead and cadmium with lactic acid bacteria isolated from raw and fermented camel milk. *Renc.Rech.Ruminants*, 16: 164.

Ali H, Khan E, et Sajad M. A. 2013. Phytoremediation of heavy metals: Concepts and applications. *Chemosphere*. 91: 869-881.

Alvarez A H, Moreno-Sánchez R et Cervantes C. 1999. Chromate efflux by means of the *ChrA* chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 181: 7398-7400.

Audry S. 2003. Bilan géochimique du transport des éléments traces métalliques dans le système fluvial anthropisé Lot Garonne- Gironde. Thèse de doctorat, université de Bordeaux I, vol : 441p.

B

Ballerini D, Gatelier C et Vogel T. 1998. Techniques de traitement par voies biologiques des sols pollués. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. Angers, Francia, 7: 18-157.

Baize D. 1997. Teneurs en éléments traces métalliques dans les sols (France) : Références et stratégies d'interprétation. Programme ASPITET. Editions Quae.

Bathla Set Jain T. 2016. Heavy Metals Toxicity. *International Journal of Health Sciences and Research (IJHSR)*, 6: 361-368.

Begley M, Hill C et Gahan C G. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1729-1738.

Beliefert C et Perraud R. 2001. Chimie de l'environnement. Air, eau, sol, déchets. 1^{ière} édition De Boeck. ISBN 2-7445-0086-0.

Benavides A B, Ulcuango M, Yépez L et Tenea G N. 2016. Assessment of the in vitro bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador. *Revista Argentina de Microbiología*, 48: 236-244.

Bestawy E, Shacker H, Hany H, Fahmy Met Ranya A. 2013. Bioremediation of heavy metal-contaminated effluent using optimized activated sludge bacteria. *Applied Water Science*, 3: 181-192.

Beveridge T J. 1989. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annual Reviews in Microbiology*, 43:147-171.

Bhakta J N, Munekage Y et Ohnishi K. 2012. Isolation and identification of cadmium- and lead-resistant lactic acid bacteria for application as metal removing probiotic. *International Journal Environmental Science and Technology*, 9: 433- 440.

Bhakta J N, Ohnishi K, Munekage Y, Iwasaki K et Wei M Q. 2012. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of applied microbiology*, 112: 1193-1206.

Bhattacharya A et Gupta A. 2013. Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich industrial wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 6628-6637.

Biney Ch, Amazu A T, Calamari D, Kaba N, Mbome I L, Naeve H, Chumba O, Osibanjo O, Radeconde V, et Massad A H S. 1991. Etude des métaux lourds présents dans l'environnement aquatique africain. Rapport de la troisième session du groupe de travail sur la pollution et les pêches Accra. Ghana. P25-29.

Bitencourt J A P, Pereira D C, da Silva Neto I D et Crapez M A C. 2016. The toxic effect of copper on the association between ciliates *Euplotesvannus* and *Euplotescrassus* and their naturally associated bacteria isolated from a polluted tropical bay. *Regional Studies in Marine Science*, 3: 25-32.

Bodek I, Lyman W, Reehi W, Resenblatt D. 1988. *Environmental Inorganic Chemistry : Properties, Process and Estimation Methods*. SETAC special publications series. New York, Pergamon Press.

Boonyodying K, Watcharasupat T, Yotpanya W, Kittit T, Kawang W, Kunthalert D et Sitthisak S. 2012. Factors affecting the binding of a recombinant heavy metal-binding domain (CXXC motif) protein to heavy metals. *Environment Asia*, 5 : 70-75.

Bouhnik, Y. 1993. Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés. *Le lait*, 73: 241-247.

Bradl HB. 2005. *Heavy Metals in the Environment, origin, interaction and remediation*. Elsevier Academic Press. Volume 6. Nombre de pages 270: 0-12-088381-3.

C

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. 2008. Détermination du chrome hexavalent : méthode colorimétrique, MA. 200 – CrHex 1.1. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec. 10.

Cervantes C, Campos-Garc J, Devars S, Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzma J C et Moreno-Sanchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 335-347.

Chang Y C, Choi D et 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: 477-480.

Chatterjee S K, Bhattacharjee et Chandra G. 2010. Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. *Journal of Hazardous Materials*, 175: 117–125.

Cloutier F, Jalby G, Lessard P et Vanrolleghem P A. 2009. Modélisation dynamique du comportement des métaux lourds dans des stations d'épuration. Dynamic modelling of heavy metals behavior in wastewater treatment plants. *Revue des Sciences de l'Eau*, 22: 461-471.

D

Dabonne S, Koffi B, Kouadio E, Koffi A, Due E et Kouame L. 2010. Traditional utensils: Potential sources of poisoning by heavy metals. *British Journal of Pharmacology*, 1: 90–92.

Da Costa A CA et 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*, 32:1-5.

De la Cueva S C, Rodríguez C H, Cruz N O S, Contreras J A R et Miranda J L. 2016. Changes in Bacterial Populations During Bioremediation of Soil Contaminated with Petroleum Hydrocarbons. *Water, Air and Soil Pollution*, 227: 1-12.

Deng X et Wang P. 2012. Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. *Bioresource Technology*, 121: 342-347.

Desboeuf K. 2004. Processus de dissolutions des aérosols atmosphériques au sein de gouttelettes nuageuses. Thèse de doctorat, Université de Paris I. 232p.

De Valdez G F et Taranto M P. 2001. Probiotic properties of *Lactobacilli*. *Food Microbiology Protocols*, 173-181.

Drouault S et Corthier G. 2001. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32: 101-117.

E

Ehrmann M A, Kurzak P, Bauer J et Vogel R F. 2002. Characterization of *Lactobacilli* towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 966-975.

El Jeni R, El Bour M et Bouhaouala-Zahar B. 2015. Caractérisation in vitro du potentiel probiotique des bactéries lactiques isolées des poissons d'eaux douces, Actes du Vème meeting: Innovation dans le secteur Halio-Alimentaire et Bioproduits: Développement de Nouvelles Procédures II, Gammarth 42 :27-29.

El Kaoutari A, Armougom F, Raoult D etHenrissat B. 2014.Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. Med Science (Paris), 30:259-65.

F

Focardi S, PepiM etFocardi S E. 2013.Microbial reduction of hexavalent chromium as a mechanism of detoxification and possible bioremediation applications. Agricultural and biological sciences, biodegradation-life of science, 12: 321-347.

G

Gadd GM. 2010. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and Bioremediation. Microbiology, 156:609–643.

García, R, Campos J, Cruz J A, Calderón M E, Raynal M E, et Buitrón G. 2016. Biosorption of Cd, Cr, Mn, and Pb from aqueous solutions by *Bacillus* strains isolated from industrial waste activate sludge.RevistaEspecializada en CienciasQuímico-Biológicas, 19: 5-14.

Gaur N, Flora G, Yadav M et Tiwari A. 2013.A review with recent advancements on Bioremediation based abolition of heavy metals. EnvironmentalScience: Processes and Impacts, 16: 180-193.

Gérard P. 2011. Le microbiote intestinal: composition et fonctions. Phytothérapie, 9: 72-75.

Giuseppe D Di, Livia VA, Chiara F, et Gianluca B. 2014. New insights on mobility and bioavailability of heavy metals in soils of the Padanian alluvial plain.Chemie der Erde, 74:615–623.

Guo H, Luo S, Chen L, Xiao X, Xi Q, Wei W, Zeng G, Liu C, Wan Y, Chen J. et He Y. 2010.Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulatorendophytic bacterium *Bacillus spL14*.Bioresource Technology, 101: 8599–8605.

Gren T, Ostash B, Hrubskyy Y, TistechokS etFedorenko V. 2013. Influence of transition metals on *Streptomycescoelicolor* and *S.sioyaensis* and generation of chromate-reducing mutants. Folia Microbiology, 59: 147-153.

Greenberg AE, Trussell R RetClescery L S.1985. “Standard methods for the examination of water and wastewater” (APHA), 16e edition;AWWA-WPCF, Washington DC.

H

Haferburg G et Kothe E. 2007. Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology*, 47: 453-467

Halttunen T, Salminen S et Tahvonen R. 2007. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 114:30–35.

Halttunen T, Collado M C, El-Nezami H, Meriluoto J, et Salminen S. 2008. Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 160-165.

Hassen A, Saidi N, Cherif M et Boudabous A. 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, 64: 7-15

Holzappel W H, Haberer P, Snel J, Schillinger U, et in't Veld J H H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101.

Holzappel W H, Haberer P, Geisen R, Björkroth J et Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365-373.

Hussein H, Ibrahim S F, Kandeel K et Moawad H. 2004. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas sp.* *Electronic Journal of Biotechnology*, 7: 30-37.

J

Jasna M, Stanzer, D, Šolić, E et Stehlik-Tomas V. 2012. Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:2771–2782.

Jiang CY, Sheng X F, Qian Met 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: 157–164.

Jumarie C, Fortin C, Houde M, Campbell P et Denizeau F. 2001. Cadmium uptake by *coco-2-cells*: Effects of Cd complexation by chloride, glutathione and phytochelatin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 170: 29-38.

K

Kacem M et Karam N E. 2006. *In vitro* preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1:27.

Kaimoussi A, Mouzdahir A et Saih A. 2005. Seasonal variations of metal concentrations (Cd, Cu, Fe, Mn and Zn) in algae *Fucus spiralis* from the coast of *El Jadida City* (Morocco). *Water Quality Research Journal of Canada*, 40:102–110.

Kakkar P et Jaffery F N. 2005. Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19:335-349.

Kampa M et Castanas E. 2008. Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution*, 151: 362-367.

Khater AA, Ali M A et Ahmed E A M. 2010. Effect of encapsulation on some probiotic criteria. *Journal of American Science*, 6: 836-845.

Kinoshita H, Sohma Y, Ohtake F, Ishida M, Kawai Y, Kitazawa H, Saito T et Kimura K. 2013. Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology*, 164: 701-709.

Klaenhammer T, Altermann E, Arigoni F, Bolotin A, Breidt F, Broadbent J, Cano R, Chaillou S, Deutscher J, Gasson M, Guchte M V, Guzzo J, Hartke A, Hawkins T, Hols P, Hutkins R, Kleerebezem M, Kok J, Kuipers O, Lubbers M, Maguin E, McKay L, Mills D, Nauta A, Overbeek R, Pel H, Pridmore D, Saier M, Sinderen D V, Sorokin A, Steele J, O'Sullivan D, Vos W, Weimer B, Zagorec M et Siezen R. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer Netherlands, 82: 29-58.

Kiyono M, Okaa Y, Sonea Y, Nakamura R, Satob M, Sakabec K, Hidemitsu P. 2013. Bacterial heavy metal transporter *MerC* increases mercury accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Engineering Journal*, 71:19- 24.

Kushwaha S, Sreedhar B et Sudhakar P P. 2012. A spectroscopic study for understanding the speciation of Cr on palm shell based adsorbents and their application for the remediation of chrome plating effluents. *Bioresource Technology*, 116: 15-23.

L

Labioui H, Laaroussi E, Yachiouim M et Ouhssine M. 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin -Société de Pharmacie de Bordeaux*, 144: 237-250.

Lauglin M C, Sigh B R. 1999. Cadmium in soils and plants. *Rlewer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands*, 273: 1-9.

Ledin M. 2000. Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*, 51: 1-31.

Lee K W, Shim J M, Park S K, Heo H J, Kim H J, Ham KS et Kim J H. 2016. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from *kimchi*, traditional Korean fermented vegetable. *LWT-Food Science and Technology*, 71: 130-137.

Leygonie, R. 1993. Les métaux lourds dans l'air: sources, émissions, mesure, effets. *Pollution atmosphérique*, 21: 63-74.

Li W, Xu B, Song Q, Liu X, Xu J et Brookes P C. 2014. The identification of 'hotspots' of heavy metal pollution in soil-rice systems at a regional scale in eastern China. *Science of the Total Environment*, 472: 407-420.

Losi ME et Frankenberger W T. 1994. Chromium-resistant microorganisms isolated from evaporation ponds of a metal processing plant. *Water Air and Soil Pollution*. 74:405-413.

Lyon D Y et Vogel T M. 2013. Bioaugmentation for groundwater remediation: an overview. In *Bioaugmentation for Groundwater Remediation*, pp. 1-37. Springer. New York.

M

Madsen K L. 2001. The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15:817-822.

Madigan et Martinko. 2007. *Biologie des micro-organismes*. Pearson Education France. 11^e édition. 82.

Mahjoub B, Fkih I et Chaker N M. 2009. Élimination du chrome hexavalent des solutions aqueuses par adsorption sur feuilles brutes de *Posidonia oceanica* (L.): cinétiques, équilibres et modélisation. *Revue Francophone d'Ecologie Industrielle - N° 55*. 23: 160-280.

Marzouk Trifi I. 2012. Étude de l'élimination du chrome VI par adsorption sur l'alumine activée par dialyse ionique croisée. Thèse de doctorat. Université Paris-Est. 67-70.

Miquel G. 2001. Rapport sur : Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques. 261: 346-344.

Mohanty M. et Patra H. K. 2011. Attenuation of Chromium Toxicity by Bioremediation Technology, In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, (ed) Whitacre D. M. New York. 210: 1-34.

Monachese M, Jeremy P B et Gregor R. 2012. Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics *Applied Microbiology and Environmental*, 51: 730-750.

Mukherjee K, Saha R, Ghosh A, Sumanta K, Pradip K et Bidyut S. 2013. Surfactant-assisted bioremediation of hexavalent chromium by use of an aqueous extract of sugarcane bagasse. *Research on Chemical Intermediates*, 40: 1727-1734.

N

Nies D H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 730-750.

Nithya C, Gnanalakshmi B et Pandian SK. 2011. Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. *Marine Environmental Research*, 71: 283-294.

Nivoliez A, Camares O, Paquet-Gachinat M, Bornes S, Forestier C et Veisseire P. 2012. Influence of manufacturing processes on *in vitro* properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *Journal of Biotechnology*, 160: 236-241.

O

Oves M, Khan M SZaidi A. 2013. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 20:121-129.

P

Pandey S, Kumar G P, Ghosh S, Kumar D T et Kanti M T. 2013. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. *Journal of Microbiology*, 51: 11–17.

Park CH, Keyhan M, Wielinga B, Fendorf S et Martin A. 2000. Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 5:1788–1795.

Patra RC, Malik B, Beer M, Megharaj M, Naidu R. 2010. Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 42:1857-1863.

Pichard A. 2003. Plombetsesdérivés. Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. ERIS- DRC, 1-90.

Pinaki S, Kazyk ,DhirajPetAngana S.2013. Metal Bioremediation by *Thermophilic Microorganisms*. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology* pp. 171-201. Springer Netherlands.

Polti M A, Amoroso M J et Abate C M. 2011. Intracellular chromium accumulation by *Streptomyces* sp. MC1. *Water, Air and Soil Pollution*, 214: 49-57.

Pophaly SD, Poonama, Prashant S, Hitesh K, Sudhir KT et Rameshwar S.2014. Selenium enrichment of *lactic acid bacteria* and *bifidobacteria*: A functional food perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 39:135-145.

Priya K, Roja1 K, PriyaA S, ArvindS et Meenakshisundaram M.2013. Detoxification and bioremediation of chromium (VI) from the tannery effluents. *International Journal of Chemical Technology Research*, 5: 2177-2185.

Q

Qian L , Zhi-hui Y, Li-yuan CH , Bing W, Shan X , Ying-ping L et Shu-juan Z.2013. Optimization of Cr(VI) bioremediation in contaminated soil using *indigenusbacteria*. Journal of Central South University, 20: 480-487.

Qing H, Dou M, Qi H, Xie X, Zhuang G, Yang M. 2007. Detection, isolation, and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE. Journal of Environmental Sciences, 19:1114–1119.

Quévrain, E. 2014. Microbiote et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Côlon et Rectum, 8 :141-145.

Quévrain, E et Seksik, P. 2013. Microbiote intestinal: de la diarrhée post-antibiotiques aux maladies inflammatoires intestinales. La Presse Médicale, 42 : 45-51.

R

Rabot S. 2015. Axe intestin-cerveau: comment le microbiote intestinal influence la réponse au stress. Séance libre.N°3, P168.

Ramade F. 1993. Dictionnaire encyclopédiques des éléments écologiques des sciences de l'environnement. Ed .Science International. 822p.

Rehman A, Shakoori F R etShakoori A R. 2006. Uptake of heavy metals by a ciliate, *Tachysomapellionella*, isolated from industrial effluents and its potential use in bioremediation of toxic wastewater. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 77:469–476.

Rodier J,Legube B etMerlet N. 2009. L'analyse de l'eau. Dunod, Paris. 9^eédition.262-263.

S

Sarkar B, 2002. Heavy metals in the environment, Edition Marcel Dekker, 743: p 288.

Sauge-Merle S, Catherine LP, Patrick C, Stéphan C et Michael Du.2012. Heavy metal accumulation by recombinant mammalian metallothionein within *Escherichia coli* protects against elevated metal exposure. Chemosphere, 88:918–924.

Shakoori A R, MakhdoomMetHaq R U. 2000. Hexavalent chromium reduction by a dichromate resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. Applied Microbiology and Biotechnology. 53: 348–351

Sharma A et Srivastava S. 2014. Anti-Candida activity of spent culture filtrate of *Lactobacillusplantarum* strain LR/14. Journal de Mycologie Médicale, 24: 25-34.

Sheng X F, Xia J J, Jiang C Y, He L Y et Qian M. 2008. Characterization of heavy metal-resistant *Endophyticbacteria* from rape (*Brassicnapus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape.Environmental Pollution, 156: 1164–1170.

SchutS, Zauner S, Hampel G, Ko'nig H et Claus, H. 2011. Biosorption of copper by wine relevant *lactobacilli*. International Journal of Food Microbiology, 145:126-131.

Sisca OL, Novie F, Felycia ES, Sunarsob J etSuryadi I. 2009. Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and waste water. Biochemical Engineering Journal, 44:19–41.

Soni S K, Singh R, Awasthi A, Singh M etKalra A. 2013. *In vitro* Cr (VI) reduction by cell-free extracts of chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil. Environmental Science Pollution Research. 20 : 1661–1674.

Srinath T, Verma T, Ramteke PW et Garg SK. 2002. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria: Chemosphere 48:427–435.

Sundar K, Vidya R, Mukherjee A et Chandrasekaran N. 2010. High chromium tolerant bacterial strains from Palar River Basin: Impact of tannery pollution. Research Journal of Environmental and Earth Sciences 2: 112-117.

Surayot U, Wangb J, Seesuriyachanc P, Kuntiyac A, Tabarsaa M, Leed Y, Kime JK, Parka W et Youa S. 2014. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structural analysis, molecular weight effect on immunomodulation. International Journal of Biological Macromolecules, 68: 233–240.

T

Talab A S, Mohamed EG, Hala E, Ghannamet Mohamed HA. 2016. Chemical compositions and heavy metal contents of *Oreochromis niloticus* from the main irrigated canals (rayahs) of Nile Delta. Egyptian Journal of Aquatic Research, 42: 23–31.

TchounwouP B, Yedjou C, PatlollaAet Sutton D. 2012. Heavy Metals Toxicity and the Environment. In Molecular, clinical and environmental toxicology. Springer Basel, 101: 133–164.

Thacker U, Parikh R, Shouche Y, etMadamwar D. 2007. Reduction of chromate by cell-free extract of *Brucella sp.* isolated from Cr (VI) contaminated sites. Bioresource Technology, 98: 1541-1547.

Thatoi H, Das S, Mishra J, Rath B P et Das N. 2014. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. Journal of Environmental Management, 146: 383-399.

TiwaryM etDubey A K. 2016. Cypermethrin bioremediation in presence of heavy metals by a novel heavy metal tolerant strain, *Bacillus sp.* AKD1. International Biodeterioration and Biodegradation, 108: 42-47.

Tsuruta T. 2006. Selective accumulation of light or heavy rare earth elements using gram- positive bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52: 117–122.

U

Urban P et Kuthan R. 2004. Application of probiotics in the xenobiotic detoxification therapy. *Nukleonika*, 49: 43-45.

V

Valls M et Lorenzo V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology*, 26: 327-338.

Vieira L, Regine H S F et Volesky B. 2000. Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiologie*, 3:17–24.

W

Wang J et Chen C. 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Advances*, 24: 427-451.

Wasi S, Tabrez S et Ahmad M. 2013. Use of *Pseudomonas spp.* for the bioremediation of environmental pollutants. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185:8147–8155.

Wei G, Lianmei F, Wenfei Z, Yunyun F, Jianfu Yet Ming T. 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*, 162:50–56.

X

Xu X, Zhao Y, Zhao X, Wang Y et 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*, 108:161-167.

Xu W H, Jian, H, Liu Y G, Zeng G M, Li X et Zhang, W. 2015. Bioreduction of chromate by an isolated *Bacillus anthracis Cr-4* with soluble Cr (III) product. *Water, Air et Soil Pollution*, 226: 1-9.

Z

Zaharah I, Wan Aet Baba A A. 2001. Bioaccumulation of silver and the isolation of metal-binding protein from *P. diminuta*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44: 223 – 225.

Zhai Q, Yin R, Yu L, Wang G, Ian F, Yu R, Zhao J, Liu X, Chen YQ, b et Zhang H, Chen W. 2015. Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. *Food Control*, 54:23-30.

Annexes

Annexe 1. Croissance des dix souches dans du bouillon MRS en présence de 10 mg/l de métal incubées à 37 °C pendant 48 h (DO 600 nm)

souche	45				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,275	0,258	0,18	0,287	0,251
T = 24 h	8,28	8,68	7,76	7,05	0,469
T = 48 h	7,99	9,38	7,1	8,04	0,778
souche	05				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,305	0,283	0,25	0,275	0,191
T = 24 h	7	8,42	7,88	7,64	0,498
T = 48 h	7,65	9,06	6,95	8,79	0,842
souche	G1				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,339	0,284	0,324	0,255	0,176
T = 24 h	5,64	7,45	8	7,42	0,362
T = 48 h	8,19	8,86	6,83	8,68	0,529
souche	Bj432				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,269	0,269	0,229	0,255	0,168
T = 24 h	6,25	8,1	7,64	7,36	0,295
T = 48 h	7,81	8,69	7,19	8,57	0,581
souche	CHT24				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,284	0,269	0,265	0,262	0,167
T = 24 h	6,7	8,29	8,01	7,02	0,414
T = 48 h	7,17	9,12	7,02	8,63	0,797

souche	15				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,222	0,296	0,177	0,5	0,17
T = 24 h	7,13	8,03	7,29	7,46	0,426
T = 48 h	8,1	10,57	7,14	8,78	0,801
souche	Lb.con				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,227	0,247	0,141	0,224	0,15
T = 24 h	6,55	7,94	7,11	7,19	0,344
T = 48 h	7,02	8,34	6,87	8,52	0,698
souche	T5				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,29	0,267	0,152	0,276	0,144
T = 24 h	7,22	9,01	7,4	8,06	0,339
T = 48 h	8,75	8,88	7,31	8,67	0,679
Souche	St.Sa				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,273	0,277	0,21	0,29	0,113
T = 24 h	7,61	8,43	7,5	8,53	0,388
T = 48 h	7,66	9,09	7,03	8,92	0,714
Souche	Lb.del				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 0 h	0,277	0,239	0,248	0,31	0,152
T = 24 h	6,88	7,98	7,65	6,87	0,446
T = 48 h	7,62	9,24	7,23	8,52	0,865

Annexe 2. Le taux de croissance (h^{-1}) des dix souches, dans du bouillon MRS additionné de 10 mg/l de Cr (VI), Fe (III), Hg(II), Pb(II) et incubées à 37 °C pendant 48 h

souche	45				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	1.210	1.358	1.752	0.980	0.036
T = 48 h	0.583	0.735	0.800	0.562	0.043
souche	05				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	0.912	1.193	1.271	1.113	0.066
T = 48 h	0.500	0.643	0.558	0.643	0.070
souche	G1				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	0.649	1.051	0.985	1.170	0.044
T = 48 h	0.480	0.628	0.417	0.688	0.041
souche	Bj432				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	0.924	1.210	1.346	1.160	0.031
T = 48 h	0.582	0.650	0.632	0.679	0.051
souche	CHT24				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	0.941	1.239	1.216	1.239	0.061
T = 48 h	0.504	0.684	0.530	0.684	0.078

souche	15				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	1.295	1.085	1.671	0.58	0.062
T = 48 h	0.738	0.721	0.818	0.345	0.077
souche	Lb.con				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	1.159	1.294	2.058	1.294	0.053
T = 48 h	0.622	0.681	0.993	0.770	0.076
souche	T5				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	0.993	1.362	1.984	1.174	0.056
T = 48 h	0.606	0.671	0.979	0.633	0.077
Souche	St.sa				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	1.118	1.226	1.445	1.181	0.101
T = 48 h	0.563	0.662	0.676	0.618	0.110
Souche	Lb.del				
Temps	Témoin	Fer	plomb	Chrome	Mercure
T = 24 h	0.993	1.348	1.242	0.880	0.080
T = 48 h	0.552	0.783	0.685	0.550	0.097

Annexe 3. Valeurs de la densité optique (DO) mesurée à 600nm pour les souches *Lactobacillus* sp(05) avec (Hg)

05	0mg/l	10mg/l	20mg/l	30mg/l	40mg/l	50mg/l	60mg/l	70mg/l	80mg/l	90mg/l	100mg/l
T=0h	0.185	0.174	0.177	0.177	0.184	0.179	0.186	0.163	0.186	0.164	0.156
T=24h	6.650	0.361	0.203	0.148	0.120	0.130	0.130	0.146	0.132	0.133	0.126

Annexe 4. Valeurs de la densité optique (DO) mesurée à 600nm pour les souches *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* (CHT24) avec (Hg)

CHT24	0mg/l	10mg/l	20mg/l	30mg/l	40mg/l	50mg/l	60mg/l	70mg/l	80mg/l	90mg/l	100mg/l
T=0h	0.182	0.172	0.174	0.175	0.175	0.168	0.171	0.168	0.172	0.166	0.170
T=24h	7.010	0.254	0.204	0.109	0.168	0.169	0.132	0.131	0.128	0.160	0.112

Annexe 5. Valeurs de la densité optique (DO) mesurée à 600nm pour les souches *Lactobacillus* *Lactobacillus* sp(45) avec (Hg)

45	0mg/l	10mg/l	20mg/l	30mg/l	40mg/l	50mg/l	60mg/l	70mg/l	80mg/l	90mg/l	100mg/l
T=0h	0.186	0.182	0.167	0.162	0.157	0.156	0.150	0.152	0.149	0.160	0.172
T=24h	5.760	0.232	0.115	0.107	0.085	0.071	0.104	0.110	0.126	0.112	0.115

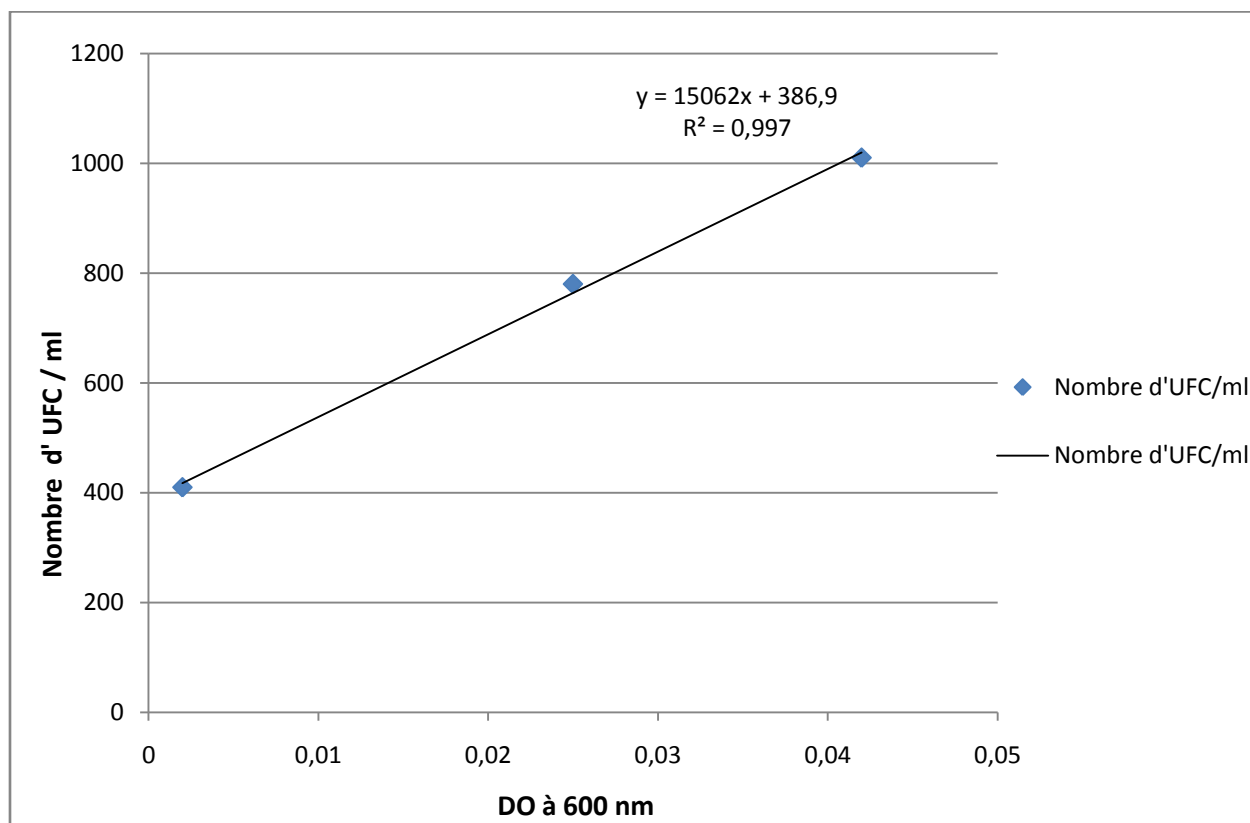
Annexe 6. Valeurs de la densité optique (DO) mesurée à 600nm pour les souches *Streptococcus* *salivarius* sp *thermophilus* (St.sa) avec (Hg)

St.sa	0mg/l	10mg/l	20mg/l	30mg/l	40mg/l	50mg/l	60mg/l	70mg/l	80mg/l	90mg/l	100mg/l
T=0h	0.204	0.157	0.169	0.168	0.167	0.170	0.159	0.150	0.159	0.148	0.146
T=24h	8.20	1.560	0.352	0.375	0.322	0.220	0.153	0.121	0.100	0.115	0.106

Annexe 7. Valeurs de la densité optique (DO) mesurée à 600nm pour la souche *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) en présence du Pb, Fe, Cr (VI)

Métaux	Chrome(VI)		Fer		Plomb	
Temps (h) [Me] en mg/l	T ₀	T ₂₄	T ₀	T ₂₄	T ₀	T ₂₄
0	0.266	7.76	0.086	7.07	0.220	6.96
10	0.516	7.79	0.093	7.39	0.215	7.11
20	0.253	6.75	0.112	6.93	0.220	7.12
30	0.315	7.81	0.123	7.69	0.240	6.64
40	0.318	7.68	0.102	7.37	0.225	6.88
50	0.325	7.86	0.238	7.17	0.225	6.61
60	0.337	7.21	0.134	7.63	0.218	6.77
70	0.321	7.46	0.188	6.68	0.213	6.89
80	0.316	7.42	0.132	7.31	0.219	6.72
90	0.293	8.96	0.168	7.46	0.208	6.85
100	0.306	7.70	0.170	6.05	0.207	6.98
110	0.362	7.26	0.335	5.56	0.212	6.50
120	0.322	7.22	0.181	4.86	0.225	6.46
130	0.338	7.34	0.240	3.88	0.237	6.44
140	0.302	7.56	0.251	3.02	0.352	6.82
150	0.293	6.82	0.364	2.22	0.231	6.48
160	0.264	7.22	0.234	1.82	0.241	6.39
170	0.271	7.62	0.327	1.36	0.228	6.27
180	0.260	7.88	0.348	0.84	0.217	6.04
190	0.220	7.77	0.332	0.22	0.208	5.80
200	0.248	7.67	0.355	0.30	0.250	4.35
250	0.216	2.24	0.324	0.24	0.247	2.24
300	0.183	0.94	0.213	0.04	0.367	0.34
350	0.248	0.35	0.198	0.02	0.359	0.27
400	0.241	0.20	0.241	0.008	0.296	0.13
450	0.232	0.09	0.310	0.01	0.266	0.006
500	0.235	0.003	0.288	0.006	0.245	0.001

Annexe 8. Courbe étalon de *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa) UFC/ml en fonction de la DO à 600 nm



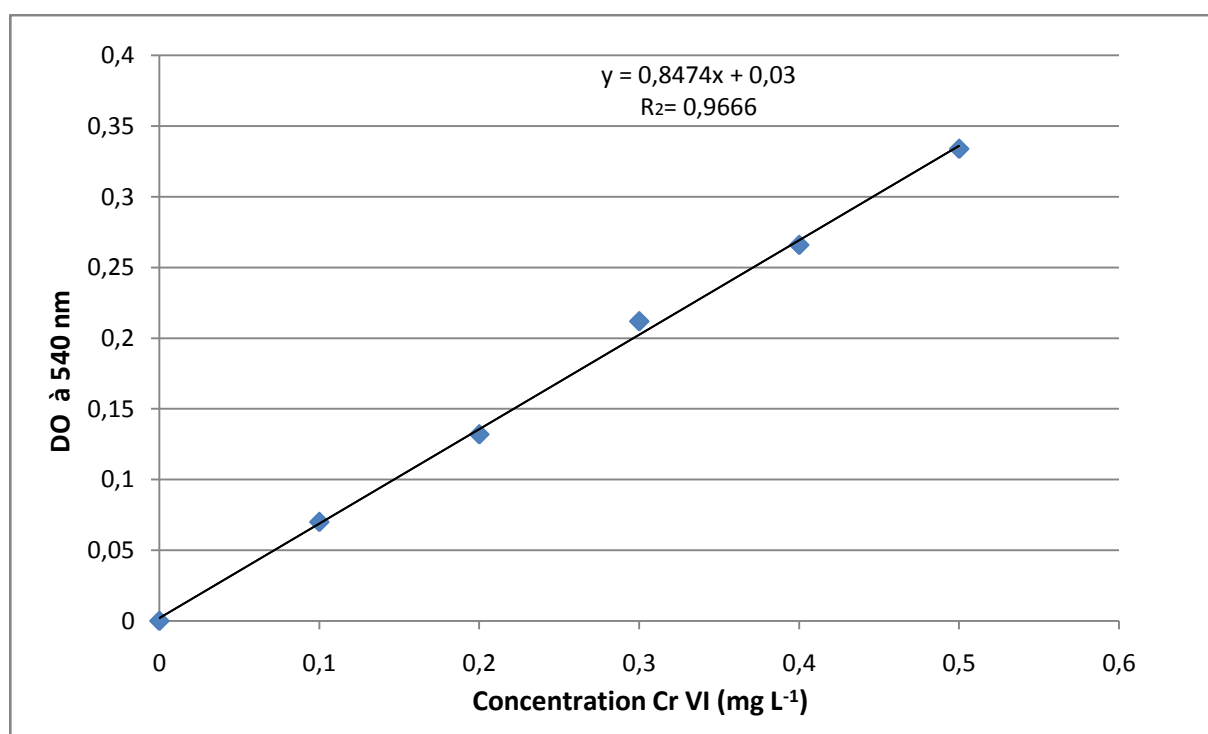
Les valeurs de DO à 600 nm et le nombre de colonies correspondant pour la réalisation de la courbe d'étalonnage de la souche *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.sa)

Dilution	DO à 600 nm	Nombre d'UFC/ml
10^{-5}	0,042	1010
10^{-6}	0,025	780
10^{-7}	0,002	410
10^{-8}	0,0014	250

Annexe 9. Cinétique de croissance de *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* (St.Sa) en présence de différentes concentrations en Cr (VI) dans le bouillon MRS à 37°C

Valeurs de la densité optique (DO) mesuré à 600 nm pour la souche « St.Sa » avec « Cr »												
[Cr] en mg/l	0	10	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
T = 0 h	0.183	0.207	0.204	0.168	0.162	0.235	0.115	0.187	0.154	0.155	0.134	0.110
T = 2 h	0.293	0.315	0.331	0.307	0.306	0.281	0.241	0.195	0.177	0.168	0.159	0.138
T = 4 h	0.954	1.042	1.002	0.964	1.055	0.881	0.710	0.575	0.345	0.253	0.196	0.175
T = 6 h	1.985	2.065	2.034	2.016	2.031	1.872	1.672	1.321	0.904	0.583	0.403	0.297
T = 8 h	2.160	2.240	2.209	2.179	2.134	2.091	1.891	1.540	1.099	0.752	0.572	0.435
T = 24 h	6.72	6.23	5.38	5.58	5.36	5.18	5.04	4.28	3.75	2.71	1.68	0.84
T = 26 h	6.99	6.60	5.70	5.32	5.06	4.84	4.42	3.49	3.18	2.24	1.02	0.14
T = 28 h	6.84	6.47	5.53	4.74	4.81	4.75	4.17	3.27	2.86	2.00	0.27	0.05
T = 30 h	6.56	5.91	4.50	4.37	4.00	4.10	3.36	2.30	2.55	1.35	0.09	0,009

Annexe 10. Courbe d'étalonnage du dosage du chrome VI par 1,5 diphenylcarbazide en fonction de la DO à 540 nm



Les concentrations des solutions étalons du Cr hexavalent préparées et les valeurs de DO mesurées à 540 nm.

Solution étalon n°	Concentration Cr(VI) (mg/L)	DO à 540 nm
01	0,0	0,000
02	0,1	0,07
03	0,2	0,132
04	0,3	0,212
05	0,4	0,266
06	0,5	0,334

Annexe 11. Préparation du milieu de culture pour (1 L)

Composition	Quantité en (g/l)
Bouillon MRS	
Peptone	10.0
Extrait de viande de boeuf	8.0
Extrait de levure	4.0
Acétate de sodium 3 H ₂ O	5.0
Phosphate dipotassique K ₂ HPO ₄	2.0
Citrate d'ammonium	2.0
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0.2
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	0.05
Glucose	20.0
Tween 80	1.0 ml
Cystéine	0.1
Eaudistillée	1000 ml
pH 6,2 ± 0.2	Ajuster par NaOH ou HCL
Gélose MRS	1 L bouillon MRS + de 15g d'agar

Annexe 12. Composition du Tampon phosphate 0,1 M (1 L)

Solution A (0.2 M NaH₂PO₄): Pesez 27.6 g NaH₂PO₄·H₂O dans 100 ml de l'eau distillée.

Solution B (0.2 M Na₂HPO₄): Pesez 53.05 g Na₂HPO₄·7H₂O dans 100 ml de l'eau distillée.

Puis on mélange 195 ml de la solution A et 305 ml de solution B et on ajuste le volume à 1000 ml avec l'eau distillée, et le pH à 7, le tampon est ensuite stérilisé par autoclavage.

Président : Pr. Lehouel Mesbah
Encadreur : Dr. Ouled Haddar Houria
Examineurs : Pr. Leghouchi Essaid
Pr. Idoui Tayeb

Présenté par :
M^{elle}. Abbas Nadjiba

Evaluation de la capacité de quelques bactéries lactiques d'origine locale à accumuler les métaux lourds

Résumé

Avec l'augmentation de la conscience publique aux effets néfastes de l'environnement contaminés par les métaux lourds sur l'être humain et la santé animale, il y a eu un intérêt croissant dans le développement des technologies de remédiation des sites contaminés. Néanmoins, peu de chercheurs indiquent l'emploi des bactéries lactiques probiotiques pour la désintoxication de ces polluants. Notre étude expérimentale a été entreprise pour mettre en évidence l'importance de certaines bactéries lactiques dans la désintoxication des métaux lourds. Dix souches de BL ont été testées pour leur capacité de résistance pour quatre métaux lourds (Cr (VI), Hg (II), Fe (III) et Pb (II)). Les résultats ont permis également de montrer une bonne capacité de résistance chez les dix souches, alors que seulement la souche *S. salivarius ssp thermophilus* (St.sa) a été étudiée, d'une part, pour son pouvoir de bioaccumulation du chrome hexavalent ce qui a révélé qu'elle est en mesure d'accumuler une concentration de 2.53 ± 0.16 mg de Cr (VI) /g de poids sec et d'autre part, pour son potentiel probiotique par sa capacité de survivre dans les conditions simulées du tractus gastro-intestinal.

Mots clés : *Bactéries lactiques, métaux lourds, probiotiques, détoxification, bioaccumulation.*

Abstract

With the increasing public awareness of the harmful effects of the environment contaminated by heavy metals on humans and animal health, there has been a growing interest in the development of remediation technologies for contaminated sites. Nevertheless, few researchers indicate the use of probiotic lactic acid bacteria for the detoxification of these pollutants. Our experimental study was carried out to highlight the importance of some lactic acid bacteria in the detoxification of heavy metals. Ten LAB strains were tested for their resistance to four heavy metals (Cr (VI), Hg (II), Fe (III) and Pb (II)). The results also showed a remarkable resistance for the ten strains, whereas only the strain *S. salivarius ssp thermophilus* (St.sa) was studied, on the one hand, for its hexavalent chromium bioaccumulation potential, which revealed that it is able to accumulate a concentration of 2.53 ± 0.16 mg Cr (VI) / g dry weight and on the other hand, for its probiotic potential by its capacity of survival in gastro-intestinal tract simulated conditions.

Key words: *Lactic acid bacteria, Heavy metals, probiotic, detoxification, bioaccumulation.*

المخلص

مع زيادة الوعي العام بالآثار الضارة للبيئة الملوثة بالمعادن الثقيلة على صحة الإنسان والحيوان، صار هناك اهتمام متزايد بتطوير تكنولوجيات المعالجة للمواقع الملوثة. ومع ذلك، يقترح عدد قليل من الباحثين استخدام البكتيريا اللبنية البروبيوتيكية لإزالة السموم من هذه الملوثات. وقد أجريت لدينا دراسة تجريبية لتسليط الضوء على أهمية بعض البكتيريا اللبنية في إزالة السموم والمعادن الثقيلة، تم فيها اختبار قدرة عشر سلالات من البكتيريا اللبنية على مقاومة أربعة معادن ثقيلة (الكروم (VI) والزنبق (II)، الحديد (III) والرصاص (II))، حيث أظهرت النتائج مقاومة جيدة لدى السلالات العشر، في حين تمت دراسة سلالة واحدة وهي *S. salivarius ssp thermophilus* (St.sa)، من جهة، لقدرتها على التكديس البيولوجي للكروم سداسي التكافؤ والتي كشفت عن أنها قادرة على جمع تركيز 0.16 ± 2.53 ملغ من الكروم (VI) / غرام من الوزن الجاف ومن جهة أخرى، لقدرتها البروبيوتيكية من خلال تكيفها في ظروف مماثلة للجهاز الهضمي.

الكلمات المفتاحية : *بكتيريا حمض اللبن، المعادن الثقيلة، البروبيوتيك، نزع السمية، التكديس الخلوي.*