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 يحي-جيجل-

Université Med –Seddik Benyahia – Jijel

كلية: علوم الطبيعة والحياة

قسم :الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : de Microbiologie Appliquée et des sciences alimentaires

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Screening des bactéries lactiques tolérantes au plomb isolées du lait et dérivés

Membres de Jury:

Présidente : M^me^ BEHAMADA .W

Examinatrice : Dr OULED HADDAR. H

Encadreur : M^me^ ROULA .S

Présenté par :

- FORTAS SOUAD
- SEBBAT FADILA

Année Universitaire 2017-2018

Numéro d'ordre bibliographique.....

REMERCIEMENTS

Nous exprimons tout d'abord, nos profonds remerciements à ***DIEU*** *tout Puissant, qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné le courage et la volonté de finir ce mémoire.*

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute notre profonde gratitude et nos remerciements à Madame ***Roula Sagia****, chef Département des et Microbiologie appliquée et sciences alimentaires à Université de Jijel pour avoir accepté la responsabilité de diriger ce travail, pour ses conseils avisés et pour ses encouragements, ainsi sa patience.*

Nous tenons à exprimer notre grande considération et nos profonds remerciements aux membres de jury qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.

En particulier

À Madame ***Behamada Wahiba*** *Pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.*

Et à Madame ***Ouled Haddar Houria*** *Pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce*
Travail.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'ensemble de nos enseignants qui ont contribué à notre formation tout au long de notre parcours pédagogique, que ce soit en Licence ou en Master.

Nos remerciements aussi l'équipe du laboratoire de Microbiologie Appliquée et l'équipe du laboratoire de recherche, en particulier Madame ***Roula Hanane*** *de nos avoir apporté toute l'aide possible pour arriver à ces résultats satisfaisants*

Sommaire

Pages

Liste des abréviations I

Liste des tableaux II

Liste des figures III

Liste des photos ..... ……...IV

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Les métaux lourds

I.1. Définition …….....3

I.2. Classification des métaux lourds…….....3

I.3. Utilisations des métaux lourds……...4

I.4. Sources des métaux …….....4

I.4.1. Sources naturelles……..…….....4

I.4. 2. Sources anthropiques……..…….....4

I.5. Toxicité des métaux lourds……....4

I.5.1. Toxicité Sur la santé humaine……...5

I.5.2. Toxicité Sur les plantes……5

I.5.3. Toxicité Sur les microorganismes ……...5

Chapitre II : Généralités sur le plomb……7

II.1. Présentation du métal ……...7

II.2. Propriétés physicochimiques du plomb…….....7

II.3. Source du plomb…….....8

II.4. Toxicité du plomb…….8

Sommaire

II .4.1. Toxicité du plomb Sur la santé humaine…….....8

II.4.2. Toxicité du plomb Sur les plantes…….9

II.4.3. Toxicité du plomb Sur les microorganismes……...10

II.5. Les méthodes d'élimination du plomb…….....10

II.5.1. Méthodes physicochimiques……...10

II.5.1.1. Adsorption…….....10

II.5.1.2. Précipitation chimique……..10

II.5.1.3. Séparation membranaire et électrodialyse..……..11

II. 5.2. Les méthodes biologiques…….....11

II.5.2.1. Biosorption…….....……..12

II.5.2.2. Bioaccumulation…….....12

II. 6. Les mécanismes de résistances …….....14

II. 6.1. Systèmes d'efflux…….....15

II.6.2. Séquestration extracellulaire……..15

Chapitre III : Les bactéries lactiques *……..…….....17*

III.1. Définition des bactéries lactiques……..17

III.2. Rôle des bactéries lactiques…….....17

III.3. Les bactéries lactiques et les métaux lourds…….....18

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel biologique…….....20

I.2.Les milieux de culture……...20

I.3 Autres matériels……20

II. Méthodes :……..22

II.1.L'isolement et caractérisation des bactéries lactiques…….22

II.1.1. Préparation de la solution mère et les dilutions décimales ……..22

II.1.2. Isolement et purification des bactéries lactiques…….....22

II.2. Identification des bactéries lactiques …….22

II.2.1. Critères morphologiques…….....22

Sommaire

II.2.1.1. Examen macroscopique……22
II.2.1.2. Examen microscopique…….....22
II.2.2. Tests physiologiques et biochimiques…….23
II.2.2.1. Test de la catalase……..23
II.2.2.2. Croissance à différentes température…….....23
II.2.2.3. Croissance sur milieu hypersalé……23
II.2.2.4. Type fermentaire……23
II.2.2.5. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)…….24
II.3. Préparation de la solution mère du métal (plomb)……...……...24
II.4. Screening de bactéries lactiques tolérantes au plomb…….....24
II.5. Détermination de la CMI…….....25
II.6. Screening des souches bactériennes produisant des exopolysaccharides…….....25
II.7. La production et extraction et quantifications des exopolysaccharides…….….....26

Résultats et discussions

I. Isolement et identification des bactéries lactiques……..27
I.1. Observation macroscopique…….....27
I.2. Observation microscopique……...27
II. Tests physiologiques et biochimiques…….……29
III. Screening des souches résistantes au plomb…….....31
IV. Détermination de la CMI…….36
V. Production d'EPS……..……38
VI. Quantification d'EPS…….....38

Conclusion

Références bibliographiques

Sommaire

Annexe

Résumé

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
ADH	Arginine Dihydrolase
ATP ases	Adenosine-Tri-phosphatase
BL	Bactérie Lactique
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
CO2	Dioxyde de Carbone
DNA	Acide désoxyribonucléique
DO	Densité Optique
EPS	Exopolysaccharides
GRAS	Generally Recognized as Safe
Mg/l	Milligramme par litre.
MRS	Man Rogosa Sharpe
Pb	Plomb
$Pb(NO3)_2$	Nitrate de plomb
PbCl2	Chlorates de plomb
PbS	Sulfure de plomb
pH	Potentiel hydrogène
PIB	pompes protéine intermédiaire
ROS	Espèces réactives de l'oxygène

Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 1	Exemples de microorganismes utilisés dans les stratégies de bioremediation des métaux lourds.	**13**
Tableau 2	Biosorption des ions métalliques par diverses bactéries lactiques.	**19**
Tableau 3	Critères macroscopiques et microscopiques des souches isolées.	**28**
Tableau 4	Profils physiologiques et biochimiques des souches bactériennes.	**30**
Tableau 5	Classification des souches isolées en fonction de ses caractéristiques morphologiques et physicochimiques	**31**
Tableau 6	Taux de croissance de dix souches	**36**
Tableau 7	Les valeurs du test CMI mesurées de la souche N2	**37**
Tableau 8	Mesure de production d'EPS sur gélose hypersaccharosée	**39**
Tableau 9	Représentation des résultats de la quantification des EPS.	**39**

Liste des Figures

N°	Titre	Page
Figure1	Mécanismes de résistance au plomb fonctionnant chez les bactéries.	**14**
Figure2	Croissance de la souche S1 dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h.	**32**
Figure3	Croissance de la souche S2dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h.	**32**
Figure4	Croissance de la souche S3 dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h	**32**
Figure5	Croissance de la souche E1 dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h.	**32**
Figure 6	Croissance de la souche F1 dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h.	**33**
Figure7	Croissance de la souche N1 dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h.	**33**
Figure8	Croissance de la souche N2 dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h.	**33**
Figure 9	Croissance de la souche N3 dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h.	**33**
Figure10	Croissance de la souche N4 dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h.	**34**
Figure11	Croissance de la souche N5 dans le bouillon MRS en absence et en présence d'une concentration de 30mg/l du plomb pendant 72h.	**34**

Liste des Photos

N°	Titre	Page
Photo 1	Observation macroscopique des bactéries lactiques sur le Gélose MRS.	**27**
Photo 2	Observation macroscopique de la purification de la souche S3.	**27**
Photo 3	Observation microscopique (objectif x100) de la souche N2 après coloration de Gram.	**29**
Photo 4	Observation microscopique (objectif x100) de la souche S3 après coloration de Gram.	**29**
Photo 5	Aspect des colonies de la souche N2 sur le milieu hypersaccharosée.	**38**
Photo 6	Aspect des colonies de la souche F1 sur le milieu hypersaccharosée	**38**

Introduction

Au cours des dernières années, l'industrialisation rapide rejette des effluents contenant des métaux lourds dans le sol et l'eau en particulier dans les zones urbaines provoquant leur accumulation dans l'environnement **(Goyal *et al.*, 2017).**

Les pollutions d'origine métallique constituent un des risques majeurs dans le monde actuel. C'est un problème d'actualité qui préoccupe toutes les régions soucieuses de maintenir leur patrimoine côtier à un haut degré de qualité. En effet, plusieurs métaux lourds peuvent être très dangereux pour la santé de l'homme et pour les autres êtres vivants lorsqu'ils sont présents dans l'environnement à des concentrations élevées **(Soro *et al.*, 2009).**

Le Cadmium (Cd^{+2}), cuivre (Cu^{+2}), plomb (Pb^{+2}), zinc (Zn^{+2}), chrome (Cr^{+2}), arsenic (As^{+2}), le mercure (Hg) et le nickel (Ni^{+2}) sont classées parmi ces polluants, ils sont non biodégradables et persistent dans les écosystèmes pour très longtemps **(Goyal *et al.*, 2017).**

Le plomb est classé parmi les 10 métaux lourds les plus toxiques dans la liste prioritaire des substances dangereuse (ATSDR 2007) **(Bhakta *et al.*, 2012).** Néanmoins, il est connu que le Pb est un métal mutagène et tératogène chez les humains et les animaux, pour cette raison l'élimination du Pb (II) est devenue une grande préoccupation mondiale en raison de ces effets toxiques sur les êtres vivants **(Soro *et al.*, 2009).** Plusieurs techniques ont été utilisées pour prévenir et gérer ce problème (adsorption, precipitation, électrodialyse, etc), mais elles ont des inconvénients ce qui conduit à la recherche d'autres solutions alternatives pour la décontamination des sites environnementaux et des humains eux-mêmes basées sur l'utilisation des microorganismes **(Gabr *et al.*, 2008).**

La détoxification et l'élimination des ions métalliques par divers bactéries ont été élucidées avec de nombreuses souches bactériennes, mais les caractéristiques et les mécanismes d'action de chaque espèce diffèrent l'une de l'autre **(Yi *et al.*, 2017).** Les bactéries lactiques (BL) et plus particulièrement les lactobacilles se lient aux métaux lourds et représentent donc une approche prometteuse pour la décontamination des métaux lourds dans les aliments et l'eau et peut-être dans le tractus gastro-intestinal **(Kirillova *et al.*, 2017).**

L'objectif principal de cette étude est porté sur la capacité des bactéries lactiques à croitre en présence de différentes concentrations du plomb.

Notre travail pratique a été divisé en 04 axes principaux :

- L'isolement et l'identification des bactéries lactiques à partir de plusieurs échantillons de l'ben.
- Screening des bactéries lactiques tolérantes au plomb

- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des souches isolées au plomb.
- La production, extraction et la quantification des exopolysaccharides.

Chapitre I : Les métaux lourds

I.1 Définition des métaux lourds

Les métaux lourds sont des éléments du tableau périodique formant des cations en solution **(Nouri et Haddioui, 2016).** Ils constituent un groupe très hétérogène d'éléments largement variés dans leurs propriétés chimiques et les fonctions biologiques **(Raikwar *et al.*, 2008).** La plupart d'entre eux sont toxique ou cancérigènes même à faibles concentrations comme le mercure (Hg), le cadmium (Cd), l'arsenic (As), et le plomb (Pb).Les métaux lourds sont caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g/cm^3, une haute conductivité électrique, malléabilité et brillance**(Jaishankar, 2014).**

Ils sont aussi appelés oligo-éléments car ils sont présents sous forme de trace (10 mg. Kg-1) ou d'ultratraces (1µg. kg-1) dans les matrices environnementales.

Certains métaux lourds, notamment l'arsenic, le cadmium, le plomb et le mercure sont des poisons cumulatifs. Ils sont persistants, accumulés et non biodégradés et leur élimination n'est pas facile dans l'environnement. Les métaux s'accumulent dans la chaîne alimentaire par l'absorption au niveau du producteur primaire puis sont transférés vers les niveaux supérieurs de la chaine trophique **(Raikwar *et al.*, 2008).**

I.2 Classification des métaux

Les métaux et les métalloïdes peuvent être classés en trois catégories selon leurs rôles biologiques et leurs effets sur les microorganismes **(Donati , 2018)** :

- **Métaux essentiels** (Na, Ca, K, Mn, Mg, V, Fe, Cu, Co, Mo, Ni, Zn et W): ils ont un rôle biologique reconnu, cependant, leurs ions deviennent toxiques si la concentration est élevée.
- **Métaux toxiques** (Ag, Sn, Cd, Au, Ti, Hg, Pb, Al et métalloïdes Ge, Sb, As, et Se): n'ont pas un rôle biologique et peuvent interférer dans les processus cellulaires.
- **Non essentiels** (Rb, Sr, Cs et T): n'ont pas un rôle biologique défini et n'ont aucune toxicité.

Les métaux essentiels fonctionnent comme cofacteurs pour les enzymes, stabilisants des structures protéiques et des parois cellulaires bactériennes, et aident à maintenir l'équilibre osmotique. Par exemple, Fe, Cu et Ni sont impliqués dans les processus redox et Mg et Zn stabilisent diverses enzymes et l'ADN par des forces électrostatiques **(Donati , 2018).**

I.3 utilisations des métaux lourds

Les métaux lourds ont été utilisés depuis longtemps par les êtres humains pour la fabrication d'alliages et de pigments métalliques pour les peintures, le ciment, le papier, le caoutchouc et d'autres matériaux. Même aujourd'hui, l'utilisation des métaux lourds dans certains pays augmentent malgré leurs effets toxiques bien connus **(Oves *et al.*, 2016).**

I.4 Sources des métaux

Les métaux lourds sont des constituants naturels de la croûte terrestre et sont libérés par les activités humaines. Ils pénètrent dans l'organisme par la nourriture, l'air, et l'eau où ils s'accumulent pendant une période de temps **(Munees, 2012).** Les métaux lourds peuvent provenir de deux types de sources: naturelles et anthropiques.

I.4.1 Source naturelle

Parmi les importantes sources naturelles des métaux lourds, citons l'éruption volcanique, l'altération des roches, les incendies de forêts et l'évaporation des océans **(Cyraniak et Draszawka, 2014).**

I.4.2 Sources anthropiques

Les teneurs les plus élevées en éléments inorganiques rencontrées dans les sols sont fortement liées à l'activité humaine. Les principales activités sont les suivantes **(Allomay, 1995)** :

- Pratiques agricoles dus aux épandages d'insecticides, de fongicides, d'engrais, de boues résiduaires ou de composts d'ordures ménagères, etc.
- La pollution dues aux retombées atmosphériques telles que l'industrie extractive et métallurgique, pratiques liées à l'incinération, l'utilisation des engrais fossiles, essence au plomb, etc.
- Stockage des déchets urbains ou industriels dus aux résidus des activités des mines et de fonderies de métaux, installation de stockage des déchets, etc.…

I.5 Toxicité des métaux lourds

Les métaux sont classés sous la catégorie des polluants environnementaux en raison de leur effet toxique sur les plantes, l'homme et la nourriture dont leur caractère persistant signifie qu'ils ne se dégraderont jamais, ni dans l'environnement, ni lors de la transformation dans les produits alimentaires, ni dans le corps **(Raikwar *et al.*, 2008).**

La toxicité se produit par le déplacement des métaux essentiels à partir de leurs sites de liaison natifs. Les métaux toxiques se lient avec une plus grande affinité aux groupes thiol et les sites de liaison de l'oxygène, comme c'est le cas des métaux essentiels. La toxicité résulte de l'altération de la conformation structurelle des acides nucléiques et des protéines et en raison de l'interférence avec la phosphorylation oxydative et l'équilibre osmotique **(Donati, 2018).**

I.5.1 Toxicité sur la santé humaine

Les métaux lourds pénètrent habituellement dans le corps humain par l'intermédiaire de différentes chaînes alimentaires, inhalation et ingestion. Ils sont susceptibles de stimuler le système immunitaire et peuvent causer des nausées, l'anorexie, le vomissement, des anomalies gastro-intestinales et des dermatites. Les métaux lourds peut perturber ou endommager le système nerveux central et mental, changer la composition du sang, endommager les poumons, les reins, le foie et d'autres organes importants. L'exposition à long terme de la population humaine aux métaux lourds a également des effets physiques, musculaires et des déficiences neurologiques. Certains métaux comme le cuivre, le Se et le Zn joueraient des rôles importants et bénéfiques au métabolisme humain, à titre d'exemple, le Cu qui a des fonctions biologiques en tant que cofacteur pour diverses enzymes du cycle redox lorsque sa concentration est faible, mis à une concentration plus élevée, il perturbe le métabolisme humain conduisant à l'anémie, dommages au niveau du foie et des reins, irritation de l'estomac et des intestins **(Oves *et al.*,2016).**

I.5.2 Toxicité sur les plantes

Dans les plantes, certains métaux lourds tels qu'As, Cd, Hg, Pb ou Se, ne sont pas essentiels pour leur croissance car ils n'effectuent aucune fonction physiologique connue. D'autres, à savoir Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni et Zn sont des éléments essentiels requis pour la croissance normale et le métabolisme des plantes, mais ces éléments peuvent facilement conduire à l'empoisonnement même à la mort de la plante **(Singh et Kalamdhad, 2011).**

I.5.3 Toxicité sur les microorganismes

L'adsorption des métaux du sol a des effets directs et indirects sur la population microbienne, le métabolisme et la différenciation des microorganismes. L'interaction des métaux et leurs composés avec les microorganismes du sol dépendent de plusieurs facteurs à savoir le type du métal, les organismes interagissant et leur habitat, leur structure et la composition, et l'activité microbienne. Certains métaux comme le Cu, le Zn, le Co et le Fe sont essentiels pour la survie et la croissance

des microbes, mais ils peuvent provoquer une toxicité à des concentrations plus élevées et peuvent inactiver les protéines.

Bien que les fonctions biologiques de certains métaux tels que Al, Cd, Hg et Pb restent inconnues, ils s'accumulent dans les cellules et peuvent: (i) affecter la sélectivité enzymatique (ii) désactiver les fonctions cellulaires (iii) endommager la structure de l'ADN et entraîner la mort cellulaire **(Oves *et al.*, 2016).**

Inversement, les effets des métaux lourds à long terme sur la population microbienne du sol peuvent augmenter la résistance de la communauté bactérienne ainsi que la tolérance des champignons tels que le mycorhize vis à vie des métaux qui peuvent jouer un rôle important rôle dans la bioremediation des écosystèmes contaminés **(Singh et Kalamdhad, 2011).**

Chapitre II : Généralités sur le plomb

II.1 Présentation du métal

Le plomb est un métal appartenant au quatrième groupe du tableau périodique avec un numéro atomique 82 **(Wuana et Okieimen, 2011)** dont le symbole chimique est Pb qui est l'abréviation du mot latin plumbum, ce qui signifie métal mou (**Pinho et Ladeiro, 2012).**

Son état d'oxydation préférentiel sous forme de sel est +2 que +4 (par ce que seulement 2 électrons s'ionisent facilement)comme dans le sulfure de plomb (PbS), qui est le sel dominant. Les sels de plomb sont peu solubles dans l'eau, en dehors des nitrates $Pb(NO3)_2$ et des chlorates (PbCl2) **(Tangahu *et al.*, 2011).**

Les composés du plomb peuvent être trouvés dans notre environnement, comme l'air, le sol et l'eau **(Sabine, 2009).**

Le plomb n'est pas biodégradable et est extrêmement persistant dans l'eau et le sol, il peut persister dans l'environnement pendant 150 à 5000 ans. Lorsque le Pb entre dans la matrice du sol, il est très difficile de l'enlever. La capacité du sol à adsorber le Pb augmente avec l'augmentation du pH, la capacité d'échange de cations, le potentiel redox, la teneur en carbone organique et les niveaux de chélates (phosphate) **(Fahr *et al* .,2013).**

Il est rarement trouvé sous forme native dans la nature, mais il se combine avec d'autres éléments pour former une variété intéressante et de beaux minéraux **(Pinho et Ladeiro, 2012).**

Le plomb est largement utilisé dans toutes les activités humaines telles que les peintures au plomb, les batteries automobiles (comme oxyde de plomb), munitions, Pb fondu liquide de refroidissement, verre plombé, cristal et combustibles fossiles **(Pinho et Ladeiro, 2012).**

II.2 Propriétés physicochimiques du plomb

Le plomb dans son état naturel est un métal gris bleuâtre, tendre, très malléable, ductile, mauvais conducteur électrique et résiste bien à la corrosion. Il a plusieurs isotopes stables dans la nature ; le 208Pb est le plus abondant d'entre eux. La masse moléculaire moyenne de Pb est 207,2, la gravité spécifique 11,34, et point d'ébullition 1740°C. Comme c'est un métal mou, il a un point de fusion bas (327°C) **(Mukesh *et al*., 2008).**

II.3 Source de plomb

La contamination des sols, de l'air et des plantes par le plomb provient des sources naturelles telles que l'érosion volcanique ou des sources anthropiques lors de l'extraction et la fusion du minerai, la combustion du charbon et du pétrole, l'incinération des déchets, l'essence au plomb, la peinture à base de plomb, des fonderies et des raffineries **(Carocci *et al* ., 2016)** , les pesticides, les poussières, les tuyaux en plomb ou plombés **(Abdullahi, 2013).**

II.4 La toxicité du plomb

Le plomb (Pb) est un élément non essentiel pour les processus métaboliques et peut être toxique ou mortel pour les organismes vivants (plantes, l'homme et microorganismes) même lorsqu'il est absorbé en petites quantités **(Sharma et Dubey, 2005).**

II.4.1 Toxicité sur la santé humaine

Le plomb peut être absorbé par l'organisme par inhalation de vapeur de plomb ou de poussières (oxyde de plomb), ingestion des aliments contaminés et les poussières présentes sur les mains ou les objets portés à la bouche notamment chez le jeune enfant, contact cutané (principalement lors d'une exposition professionnelle) ou par transmission à travers le placenta **(Wani et Ara ,2015).**

Après sa pénétration dans le corps, le plomb se lie avec les érythrocytes et est transféré avec le sang dans les tissus mous (le foie, les reins, les poumons, le cerveau, la rate, les muscles et le cœur). Au bout de quelques semaines, la plus grande partie du plomb s'accumule dans les os et les dents où il peut y résider pendant de nombreuses années **(Kosek –Hoehne *et al*., 2017).**

L'exposition aigue au plomb peut entrainer une perte d'appétit, des maux de tête, hypertension, douleur abdominale, dysfonctionnement rénale, fatigue, insomnie, arthrite, hallucination et vertige, alors qu'une exposition chronique peut entraîner chez l'enfant une déficience de son développement intellectuel, des problèmes de comportement, une altération de la fonction auditive et une perturbation de la croissance, des mal formations congénitales, une psychose, l'autisme , allergie, dyslexie, perte de poids, hyperactivité, paralysie, faiblesse musculaire, lésion cérébrale, dommage des reins et même la mort **(Arif *et al* ., *2015*).**

Le plomb provoque aussi des effets néfastes sur le système de reproduction chez les hommes et les femmes. Les effets communs chez l'homme sont : une réduction de la libido, une spermatogenèse anormale (motilité et nombre réduits), des dommages chromosomiques, l'infertilité, fonction anormale de la prostate ainsi que des changements dans la testostérone sérique. Les femmes sont les

plus sensibles à ce métal qui peut provoquer l'infertilité, fausse couche, rupture prématurée de la membrane, pré-éclampsie, grossesse, l'hypertension et l'accouchement prématuré.

De plus, pendant la période de gestation, l'influence directe du plomb sur les stades de développement du fœtus a également été rapportée **(Flora *et al.*, 2012).**

II.4.2 Toxicité sur les plantes

Le plomb n'est pas un élément essentiel pour la plante, il s'accumule dans les parties de la plante et affecte négativement divers processus physiologiques. Les plantes peuvent absorber du plomb à partir des racines, mais également à partir des organes aériens, ou bien par l'intermédiaire des deux. Les quantités du métal absorbées par les racines dépendent de la concentration du métal dans la solution du sol, mais également de ses capacités de migration du sol vers la surface des racines **(Patra *et al* .,2004).**

Parmi les effets généraux visuels de la toxicité du Pb pour les plantes : une inhibition rapide de la croissance des racines et la partie aérienne, croissance sous-développée de la plante, noircissement du système racinaire et chlorose. Le Pb inhibe également la photosynthèse, il baisse la nutrition minérale et l'équilibre hydrique, ces troubles perturbent les activités physiologiques normales de la plante, de même, le Pb inhibe la germination des graines et retarde la croissance des plantules **(Fazal, 2015).**

Le plomb inhibe aussi les activités enzymatiques, altère l'activité et la quantité de l'enzyme clé de diverses voies métaboliques telles que ceux du cycle photosynthétique de Calvin, le métabolisme de l'azote et le métabolisme du sucre, une inhibition de la biosynthèse de la chlorophylle, influence la respiration et la perméabilité de la membrane cellulaire **(Xiao *et al.* ,2011).**

On admet généralement que ces perturbations résultent d'un stress oxydatif dû à la production des espèces réactives de l'oxygène ou « Réactive Oxygèn Species : l'anion superoxyde (O2-), l'oxygène singulet (1O2), le radical hydroxyle (OH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) **(Srivastava *et al.*, 2015),** ces ROS peuvent constituer une menace grave lorsqu'ils sont produits en plus grandes quantités.

Les ROS peuvent attaquer rapidement tous les types des biomolécules telles que les acides nucléiques, les protéines, les lipides et les acides aminés, ce qui conduit à un dysfonctionnement métabolique irréparable et donc la mort cellulaire **(Fazal, 2015).**

II.4.3 Toxicité sur les microorganismes

Plusieurs recherches indiquent que les nanoparticules de plomb peuvent agir en tant que médicaments antimicrobiens importants pour de nombreux microorganismes. ces nanoparticules de plomb ont la capacité de se fixer sur la paroi cellulaire du microbe et former des pores afin de pénétrer à l'intérieur de la cellule où ils s'accumulent, la perturbation de la perméabilité de la membrane cellulaire provoque la mort de la cellule. ces nanoparticules ont aussi la capacité de pénétrer dans le système respiratoire du microbe et inhibes certains enzymes respiratoires en provoquant des changements dans leur structure et la libération des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui conduit à la destruction cellulaire par apoptose **(Elbossaty, 2017).**

II.5 Les méthodes d'élimination de plomb

L'élimination de métaux lourds peut être réalisée par différentes méthodes **(Sharma *et al.*, 2016).**

II.5.1 Les méthodes physicochimiques

Il existe différentes méthodes physiques et chimiques d'élimination des métaux lourds de l'eau potable, les plus utilisées sont la floculation, précipitation, échange d'ions et filtration sur membrane **(Zoghi, 2014).**

II.5.1.1 Adsorption

L'adsorption est un processus au cours duquel une matière soluble s'accumule à la surface d'une autre substance, cela est très important pour de nombreuses méthodes physiques, chimiques et biologiques. Un des adsorbants les plus largement utilisés à cette fin est le charbon actif. Le coût élevé des étapes d'activation et sa faible capacité de régénération limite son utilisation à grande échelle. Ces dernières années, l'utilisation des bioadsorbants pour l'élimination des ions métalliques présents dans les solutions aqueuses est moins couteuse et peut être considérée comme une méthode respectant l'environnement **(Dowlatshahi *et al.*, 2014).**

Les principaux avantages de l'adsorption comprennent l'efficacité à haut / basse concentrations des contaminants, sélectivité en utilisant des adsorbants adaptés, capacité de régénération des adsorbants utilisés et à bas prix **(Sharma et *al.*, 2016).**

II.5.1.2 Précipitation chimique

La précipitation chimique est parmi les méthodes les plus utilisée pour l'élimination des métaux lourds des effluents dans l'industrie en raison de son fonctionnement simple. Les procédés de

précipitation chimique conventionnels produisent des précipités insolubles de métaux lourds sous forme d'hydroxyde, de sulfure, de carbonate et de phosphate **(Gunatilake, 2015)**. Cette technique repose sur l'utilisation des coagulants tels que la chaux hydratée, l'alun, le chlorure ferrique, le cuivre chloré et d'autres polymères organiques **(Prathiksha, 2018).**

La précipitation de Pb (II) est utilisée par plusieurs microorganismes pour abaisser la concentration de Pb (II) en le séquestrant sous forme de sels de phosphate à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule **(Jarosławiecka et Piotrowska , 2014).**

II.5.1.3 Séparation membranaire et électrodialyse

L'Electro Dialyse (ED) est un processus membranaire où les ions sont transportés à travers une membrane semi-perméable dont le potentiel électrique est la force motrice. Les membranes sont sélectives pour les cations ou les anions. Des ions positifs ou des ions négatifs circulent à travers la membrane. Les membranes à sélectivité cationique sont des polyélectrolytes à matière chargée négativement, qui rejettent les ions chargés négativement et permettent le passage des ions chargés positivement **(Raut *et al* ., 2015).**

Les méthodes physiques et chimiques traditionnelles ont été largement utilisés pour l'élimination des métaux lourds de l'eau potable, mais ils ont plusieurs inconvénients tels que : une élimination incomplète et inefficace à des faibles concentrations de métaux, besoins élevés en réactifs ou en énergie, les exigences du personnel opérationnel formé et la génération de boues toxiques ou d'autres déchets qui doivent être éliminés **(Zoghi *et al* .,2014).**

II.5.2 Les méthodes biologiques

Les méthodes biologiques telles que la biosorption / bioaccumulation pour l'élimination des ions de métaux lourds peuvent fournir un alternative attractive aux méthodes physico-chimiques **(Igwe et Abia, 2006).** Elles présentent des avantages distincts par rapport aux méthodes conventionnelles: peuvent être très sélectives, plus efficaces, faciles à utiliser, et donc rentables pour le traitement des grands volumes d'eaux usées contenant de faible concentrations des métaux **(Murthy *et al.*, 2012).**

Au cours des dernières décennies, une vaste gamme de matériel biologique naturel en particulier les bactéries, les algues, les levures et les champignons attire beaucoup l'attention pour résoudre le problème de contamination par les métaux lourds **(Patel *et al.*, 2017).**

II.5.2.1 Biosorption

Le processus de biosorption implique des interactions entre les ions métalliques toxiques et la biomasse microbienne. Les mécanismes de sorption à la surface de la biomasse sont conditionnés par les interactions physico-chimiques entre le métal et les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire de certaines algues, champignons et les bactéries qui sont responsables de ce processus **(Zabochnicka et Krzywonos, 2014).**

La biosorption est due à divers groupes chimiques chargés négativement présents sur la surface de la cellule bactérienne. Le groupe carboxyle du peptidoglycane sert de site principal de liaison du métal à la paroi cellulaire des bactéries Gram-positifs, alors que les groupes de phosphate contribuent significativement en cas de bactéries Gram négatif **(Naik *et al.*, 2013).**

L'efficacité de la biomasse utilisée dans la biosorption dépend de plusieurs facteurs, y compris la capacité, l'affinité et la spécificité des biosorbants et de leurs conditions physico chimiques dans les effluents. Les avantages majeurs de la biosorption par rapport aux méthodes de traitement conventionnelles sont: faible coût, rendement élevé, minimisation des boues chimiques et biologiques et la régénération du biosorbants. Permet les inconvénients de la biosorption on cite la saturation précoce, c'est-à-dire lorsque des sites interactifs du métal sont occupés, la désorption de métal est nécessaire avant toute utilisation ultérieure, le potentiel d'amélioration du processus biologique (par exemple grâce au génie génétique des cellules) est limité parce que les métaux ne sont pas métabolisées ; et il n'y a aucun potentiel pour modifier biologiquement l'état de valence des métaux **(Das *et al.*, 2007).**

II.5.2.2 Bioaccumulation

La bioaccumulation est un processus métabolique-dépendant qui a besoin de l'approvisionnement en énergie, elle permet de lier et d'accumuler les métaux toxiques ou les substances organiques à l'intérieur d'une structure cellulaire dont le métal interagit avec les sites fonctionnels présents à la surface des cellules, puis il pénètre à l'intérieur de la cellule.

L'activité biologique de la biomasse est essentielle dans le processus de bioaccumulation dont les cellules adsorbent les contaminants par les fonctions métaboliques **(Zabochnicka et Krzywonos, 2014).**

Les principaux inconvénients de ce processus sont les suivants: Les microorganismes vivants ont besoin d'approvisionnement continu en nutriments, les métaux lourds peuvent être très toxiques

pour leurs processus métaboliques, le pH et la température peuvent affecter la croissance des bactéries **(Aryal *et al.*, 2014).**

L'accumulation intracellulaire des ions métalliques dans les cellules microbiennes vivantes commence lorsque la plupart des sites, disponibles pour la liaison des ions métalliques sur la paroi cellulaire, sont occupés **(Mrvcic *et al.*, 2012).**

Divers microorganismes (tableau 1) ont été utilisés avec succès dans les processus de bioremediation pour le traitement des effluents et l'élimination des substances toxiques présentant un risque pour les être vivant **(Abatenh *et al.*, 2017).**

Tableau1. Exemples des microorganismes utilisés dans les stratégies de bioremediation des métaux lourds **(Perpetuo, 2011)** :

Organismes	**Genre/espèce**
Bactéries	*Arthrobacter* *Bacillus sp* *Citrobacter* *Cupriavidusmetallidurans* *Cyanobacteria* *Enterobacter cloacae* *Pseudomonas aeruginosa* *Streptomyces sp* *Zoogloea ramigera*
Archaea	*Filocrenarchaeota* *Phanerochaete chrysosporium*
Champignons	*Aspergillus tereus* *Penicillium chrysogenum*
Levures	*Candida utilis* *Hansenula anomala* *Rhodotorula mucilaginosa* *Rhodotorula rubra GVa5* *Saccharomyces cerevisiae*

II.6 Les mécanismes de résistances

Pour survivre dans un environnement stressé par les métaux, les bactéries ont développé plusieurs mécanismes de résistances pour tolérer l'absorption des métaux (figure 1) **(Spain et Alm, 2003).**

La résistance des bactéries vis-à-vis des métaux lourds résulte de leur contact primaire avec ces dernier, ce phénomène apparait naturellement dans l'environnement **(Jarosławiecka et Piotrowska , 2014).**

Les mécanismes de résistance au Pb varient en fonction du microorganisme et de la disponibilité du métal dans le sol. Le trait de résistance métallique dans les microorganismes est régulé par des gènes organisés en opérons. En général, les gènes de résistance aux métaux lourds se trouvent sur l'ADN circulaire extra-chromosomique, c'est-à-dire sur le plasmide porté par des bactéries résistantes aux métaux. Les gènes de résistance aux métaux lourds sont exprimés et induits en présence des métaux spécifiques au voisinage de la niche bactérienne **(Munnes *et al.*, 2012).**

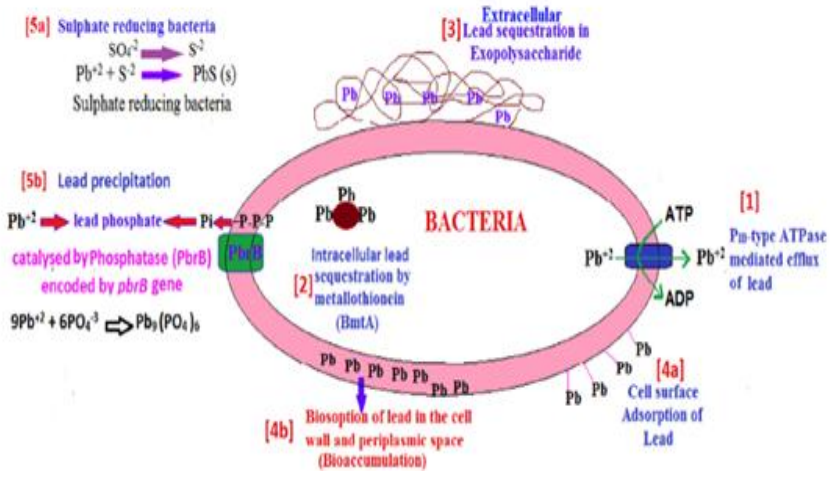

Fig. 1 : Mécanismes de résistance au plomb fonctionnant chez les bactéries, (1) efflux de plomb médiatisé par l'ATPase de type PIB, (2) séquestration du plomb par la methallothionein (BmtA), (3) séquestration du plomb dans l'exopolysaccharide, (4a) adsorption superficielle du plomb, (4b) la biosorption du plomb dans la paroi cellulaire et l'espace périplasmiques (bioaccumulation), la précipitation du plomb par les bactéries réductrices du surfate, (5b) la précipitation du plomb catalysée par l'enzyme phosphatase (PbrB) **(Naik et Dubey, 2013).**

II.6.1 Systèmes d'efflux

Afin de maintenir l'homéostasie des métaux lourds, le niveau intracellulaire des ions métalliques toxiques doit être étroitement contrôlé**.** Les ATPases de type PIB sont un groupe de protéines impliquées dans le transport des métaux lourds à l'extérieur de la membrane cellulaire et impliquées aussi dans la résistance bactériennes. Ces protéines de transport empêchent la sur-accumulation de Pb (II) hautement toxiques et réactifs **(Naik et Dubey, 2013)**.

Les pompes PIB ont été largement reconnues dans la plupart des espèces bactériennes et archéennes. Parmi elles, CadA de *Staphylococcus aureus*, ZntA d'*Escherichia coli*, CadA2 de *Pseudomonas putida* KT2440 et PbrA de *Cupriavidus metallidurans* CH34 sont connus pour transporter Pb (II), au périplasme. Jusqu'à présent, seul CzcCBA1 de *Ps. putida* KT2440, un transporteur transmembranaire appartenant à la famille ABC a été reconnu et participe à l'exportation de Pb (II) de la cellule **(Jarosławiecka and Piotrowska , 2014).**

II.6.2 Séquestration extracellulaire

Afin de contourner l'effet toxique des métaux lourds, les microorganismes ont recours à une stratégie d'immobilisation du métal.

Les exopolysaccharides (EPS), biopolymères extracellulaires de haut poids moléculaire sécrétés par des cellules bactériennes se composent de macromolécules telles que des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, lipides et autres constituants non polymérisés de faible poids moléculaire . Ces exopolysaccharides sont hétérogènes possédant des groupes fonctionnels tels qu'hydroxyle, carboxyle, amides et phosphoryle qui présentent une forte affinité vis-à-vis des métaux

Les polymères microbiens ont la capacité de lier les métaux lourds, y compris le plomb, avec différents degrés de spécificité et affinité.

Les EPS sont des polymères polyanioniques avec un poids moléculaire élevé qui lient les métaux par interactions électrostatiques entre le cation métallique et les composants d'EPS chargés négativement entraînant l'immobilisation du métal dans la matrice exopolymérique **(Naik et Dubey, 2013).**

Un autre exemple de séquestration extracellulaire est la précipitation des métaux sous forme de complexe insoluble. Les bactéries réductrices de sulfates génèrent des grandes quantités de sulfure d'hydrogène qui provoquent la précipitation d'un certain nombre de cations métalliques.

En outre, les bactéries sulfuriques pourraient précipiter les ions métalliques comme d'autres composés insolubles. La souche *Vibrio harveyi* précipite le plomb divalent soluble sous forme de sel complexe de phosphate de plomb **(Ianieva, 2009).**

Chapitre III : Les bactéries lactiques :

III.1 Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram-positif, sous forme de bâtonnet ou de coque, sont immobiles et asporulées. Elles ont également un métabolisme aérobie facultatif et ne produisent pas de catalase **(Drouault et Corthier, 2001).** Ces bactéries appartiennent à deux phylums distincts, à savoir Firmicutes et Actinobacteria.

Dans les Firmicutes, les bactéries lactiques appartiennent à l'ordre Lactobacillales et comprennent les genres suivants: *Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium*, *Enterococcus ,Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Symbiobacterium, Tetragenococcus, Vagococcus et Weissella*, alors que le phylum des Actinobacteria comprennent seulement les espèces du genre *Bifidobacterium* **(Liu *et al.*, 2014).**

Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Certaines sont dites homofermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétérofermentaires car elles produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate et éthanol en général) **(Konig, 2009).**

Elles se trouvent dans les environnements riches en substrats glucidiques, tels que les matières végétales et les fruits en décomposition, dans les produits laitiers, dans la viande fermentée et dans les poissons, céréales, betteraves, légumes marinés, pommes de terre, levain, boissons fermentées, jus et eaux usées. Elles font partie de la population microbienne du tube digestif des humains et des animaux en bonne santé, et sont impliqués dans leur métabolisme **(Wierzba, 2015).**

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et sont considéré comme organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) **(Drouault et Corthier, 2001).**

III.2 Rôle des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) sont des bactéries non pathogènes et sans danger pour la production de nombreux produits alimentaires fermentés. Ils fermentent le glucose en acide lactique et acétique, l'éthanol et le CO2, ce qui contribue à une meilleure qualité, la texture et l'arôme des produits fermentés. Les BL produisent également des bactériocines et d'autres composés qui inhibent la croissance de microorganismes indésirables présents dans les aliments **(Wierzba, 2015).**

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans la nourriture, la fermentation des aliments et la conservation soit comme microflore naturelle ou comme culture starter ajoutée dans des conditions contrôlées **(Egbe *et al.*, 2017).**

III.3 Les bactéries lactiques et les métaux lourds

Les bactéries lactiques sont des organismes idéaux à utiliser comme un outil auxiliaire pour prévenir et réduire la toxicité des métaux lourds et empêcher leur absorption dans le corps humain **(Kirillova *et al.*, 2017).**

De nombreux mécanismes ont été utilisés par les bactéries pour tolérer ou résister aux composés de Pb. La limitation du mouvement des métaux à travers la paroi cellulaire est un mécanisme utilisé par les bactéries pour prévenir l'intoxication. La paroi cellulaire agit comme une barrière contre les ions Pb. Surtout chez les bactéries à Gram positif, le Pb se liera à la couche de peptidoglycane ainsi qu'aux acides teichoïques et lypoteichoiques présents sur la paroi cellulaire **(Huët *et al.*, 2017).**

En outre, les métabolites macromoléculaires produits par les BL ont des groupes chargés qui permettent au Pb de se lier et se séquestrer à la surface des cellules par des interactions électrostatiques. Les BL secrètent des exopolysaccharides (EPS) dans l'environnement extracellulaire pendant la croissance, qui sont considérés comme des biosorbants pour l'élimination des métaux lourds **(Derong *et al*., 2017).**

Un mécanisme commun utilisé par les espèces *Enterococcus* et *Bacillus* implique l'utilisation de pompes ATPase de type P qui régulent le mouvement des ions métalliques à travers la membrane cellulaire **(Huët *et al.*, 2017).**

Le rôle détoxifiant des bactéries lactiques a été l'objet de nombreux travaux.

Les études obtenue par Ibrahim *et al*., 2007 ont comparé la capacité de deux probiotiques communs, *L. rhamnosus* LC-705 et *Propionibacterium freudenreichii*, à lier et adsorber le plomb et le cadmium en solution. Il y a une capacité rapide des bactéries à lier des quantités maximales du métal après 1 h d'exposition.

Les études de Halttunen *et al.,* 2007 montrent que les espèces *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* peuvent lier le plomb et le cadmium en solution. Ils ont observé un phénomène de liaison rapide dans les espèces étudiées, les plus grandes quantités de plomb et de cadmium étant fixées entre 5 min et 1 h **(Monachese *et al* ., 2012).**

La liaison des bactéries lactiques aux métaux lourds dépend de la souche, de la température et du pH. En raison de l'adsorption rapide de Cd et Pb à partir d'une solution aqueuse, le mécanisme de liaison passive des ions métalliques à la surface des bactéries a été suggéré plutôt que l'accumulation à l'intérieur de la cellule selon ; plusieurs mécanismes réversibles tels que l'échange d'ions et la précipitation sont impliqués dans la liaison de Cd et Pb par Lb **(Kirillova *et al.*, 2017).**

Les bactéries lactiques les plus connues par leur capicité de biosorption des ions métalliques présentées dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Biosorption des ions métalliques par diverses bactéries lactiques **(Mrvcic *et al.*, 2012).**

Métal	Bactérie lactique	Adsorption		Conditions de fonctionnement optimales	
		q_{max}(mg/g)	b	Ph	T(C°)
Pb	*Lactobacillus kefir*	-	-	-	30
	L. rhamnosus GG	107.4[a] 46.8[b]	0.05[a] 0.09[b]	5.0	37
	L. rhamnosus LC-705	49.3 29.1[a]	0.10 0.38[a]	5.0	21
	L. casei Shirota	97.6[a] 70.4[b]	0.06[a] 0.15[b]	5.0	37
	L. fermentum ME3	136.1[a] 142.6[b]	0.10[a] 0.15[b]	5.0	37
	Bifidobacterium lactis BB-12	111.3[b]	0.5[b]	5.0	37
	B. longum 2C	47.1 45.4[b]	0.12[a] 0.5[b]	5.0	37
	B. longum 46	175.7[a] 93.8[b]	0.03[a] 0.33[b]	5.0	37
	Propionibacteriumfreudenreichiijs	79.1 108.6[a]	0.03 0.02[a]	5.0	21

- : Pas de biomasse vivante. b : Cellules lyophilisées.

a : une biomasse tuée par la chaleur. q_{max} : quantité maximal.

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire du Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période Mai - Juin 2018.

Ce travail nous a permis d'étudier : la résistance des bactéries lactiques au plomb, l'effet du plomb sur la croissance bactérienne, la caractérisation des souches sélectionnées pour l'étude, détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la confirmation de la production des exopolysaccharides par les souches isolées.

L'objectif de ce travail était d'étudier la capacité de résistance des bactéries lactiques au plomb isolées à partir des échantillons de L'ben.

I. Matériel

I.1 Matériel biologique :

Les souches microbiennes utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de quatre échantillons de L'ben artisanal de différentes région de Jijel.

I.2 Les milieux de culture :

- Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe) (Annexe 1).
- Gélose MRS (Man Rogosa et Sharpe).
- Gélose hypersaccharosée.
- MRS modifié.
- Bouillon Môeller à arginine

I.3 Produits chimiques et réactifs :

- Nitrate de plomb $Pb(NO3)_2$.
- L'éthanol à 95°.
- Acide (TCA).
- Phénol.
- Acide sulfurique.
- Glucose.
- L'eau physiologique
- Eau oxygénée.
- Eau distillée.
- Hydroxyde de sodium (NaOH) (1⁄9 N).

- Acide chlorhydrique concentré(HCl).
- Solution physiologique de NaCl.
- Tween 80(additif du milieu MRS).
- Peptone.
- Extrait de viande.
- Extrait de levure.
- Acétate de Sodium.
- Hydrogénophosphate de Potassium.
- Sulfate de magnésium heptahydraté.
- Sulfate de manganèse tétra hydraté.
- Agar-Agar.

I.4 Appareillage :

- Bec Bunzen.
- Autoclave (Slli AVX éléctric).
- Four pasteur (Memmert).
- Etuve 37°C (Memmert).
- Etuve 44°C.
- Spectrophotomètre optique (specord plus).
- pH mètre (Hanna).
- Balance électronique (Kern EMB 600-2).
- Agitateur magnétique chauffant (Heidolph MR 3002).
- Vortex (VWR).
- Réfrigérateur (ENIEM).
- Micropipette.
- Centrifugation à 4°C.
- Microscope optique.

II. Méthodes

II.1 Isolement et caractérisation des bactéries lactiques du L'ben

L'ben a été choisi parmi les produits laitiers pour l'isolement des bactéries lactiques.

II.1.1 Préparation de la solution mère (SM) du L'ben

1ml de l'échantillon est placé dans un tube stérile contenant 10 ml d'eau Physiologique stérile, ensuite des dilutions décimales ont été préparées de 10^{-1} à 10^{-3}.

II.1.2 Isolement et purification des isolats

L'isolement des bactéries lactiques a été réalisé sur gélose MRS dont 0.1ml des dilutions 10^{-2} et 10^{-3} de chaque échantillon est ensemencées par étalement dans des boites de Pétri contenant la gélose MRS préalablement coulée et solidifiée. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h à 48h en conditions anaérobie.

La purification a été réalisée par des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, avec une incubation à 37°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, même forme et même couleur **(Zantar *et al.*, 2013).**

II.2 Identification des bactéries lactiques

L'identification des souches est réalisée grâce à des techniques classiques de microbiologie basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques **(Dahou *et al.*, 2015).**

II.2.1 Critères morphologiques

II.2.1.1 Caractérisation macroscopique

Une observation macroscopique à l'œil nu a permis de décrire les caractères culturaux des colonies obtenues sur gélose MRS (forme, aspect, couleur et disposition).

II.2.1.2 Caractérisation microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dont le but est d'écarter tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram. Celle-ci a permis de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement **(Zantar *et al.*, 2013).**

II.2.2 Tests physiologiques et biochimiques

- **La revivification des souches**

Avant la réalisation des tests d'identifications, les souches ont été revivifiées sur bouillon MRS et incubées à 37° pendant 18h.

II.2.2.1 Recherche de la catalase :

Ce test a été effectué afin de déterminer la capacité des cultures isolées à dégrader le peroxyde d'hydrogène par la production d'enzyme catalase. La réaction est représentée par la réaction suivante **(Arimah et Ogunlowo, 2014) :**

$$H_2O_2 \xrightarrow[\text{Catalase}]{} 2H_2O+O_2$$

Une colonie typique de la culture a été placée sur une lame de verre propre puis une goutte de la solution de peroxyde d'hydrogène a été ajoutée. Une réaction positive se traduit par un dégagement de bulle **(Ahirwar *et al.*, 2017).**

II.2.2.2 Croissance à différentes températures

Le but de ce test est de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles, dont la croissance bactérienne est évaluée par l'apparition d'un trouble en bouillon MRS après 1 ou 2 jours d'incubation à 15°C, 25°C, 30°C et 44°C **(Ahirwar *et al.*, 2017).**

La thermorésistante des souches a été testée au bain marie à 60°C pendant 30 mn et 55°C pendant 15 mn puis les cultures sont incubé à 37°C pendant 24 à 48h **(Zarour *et al.*, 2012).**

II.2.2.3 Culture sur milieu hypersalé

Ce test permet de distinguer les espèces sensibles aux variations de la pression osmotique.

Les cultures à tester ont été ensemencées sur des bouillons en présence de 4% et à 6.5% de NaCl **(Idoui et Karam, 2008).** Après une incubation à 37°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble.

II.2.2.4 Type de fermentation

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme (homofermentaires des hétérofermentaires) par lequel le substrat carboné est transformé **(Rizqiati *et al.*, 2016).** Pour cette raison des tubes à essai

stériles contenant 10 ml de bouillon MRS et une cloche de Durham (inversée et plongée) ont été inoculés avec une colonie de chaque souche et incubées à 37 ° C pendant 24 à 48 h. L'accumulation de gaz dans les tubes de Durham a été prise comme preuve de la production de CO_2 à partir du glucose **(Ahirwar *et al.*, 2017).**

II.2.2.5 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citrulline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, le bouillon Môeller à arginine a été ensemencé par les cultures à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû à la fermentation du glucose dont les bactéries qui ont l'enzyme ADH dégradent l'arginine en ammoniac et le milieu vire au violet, dans le cas d'une réaction négative le milieu reste jaune (absence d'enzyme ADH) **(sadi, 2017).**

II.3 Préparation de la solution mère du métal (plomb)

Afin de préparer une concentration égale à 1000 mg/L, des calculs ont été fait pour déterminer la masse en gramme de métal utilisé dans cette étude par la méthode suivante :

SM : Plomb 1000 mg/L

Masse molaire du $Pb(NO3)_2$ = 321.2 g/mol.

Masse molaire du (Pb) = 207.2g/mol

m = 1000 X 321.2 / 207.2 = 1.55 g

Pour préparer la solution mère à 1000 mg/L, **1.55 g** de nitrate de plomb sont dissous dans 1L d'eau distillée **(Kinoshita *et al.*, 2013).**

II.4 Screening des bactéries lactiques tolérantes au plomb

Ce test a été réalisé afin de sélectionner les souches bactériennes qui ont la capacité à résister au plomb, pour cette raison les cellules bactériennes ont été cultivées à 37°C pendant 18h puis réensemencées dans 10 ml de bouillon MRS contenant une concentration à 30mg/l de plomb. Parallèlement, un témoin ne contenant que du bouillon MRS et la culture a été préparé pour chaque souche bactérienne.

La croissance de chaque souche a été évaluée par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à partir de T_0 jusqu'à 72h.

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

$$\mu = \frac{1}{DO0} \times \frac{(DOt - DO0)}{(Tt - T0)}$$

DOt : densité optique à un temps t

DO_0 : densité optique à un temps t

T_t : temps après incubation

T_0 : temps initial

II.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Afin de suivre la croissance d'une souche lactique en présence de différentes concentrations du plomb, le test de la détermination de la concentration minimale inhibitrice a été réalisé.

Ce test consiste à préparer un gradient de concentrations croissant en Pb allant de 50 mg/L à 400 mg/L **(Yaghoobizadeh *et al.*, 2017).**

La souche N2 a été inoculée dans des tubes à essai stériles contenant le bouillon MRS avec des concentrations croissantes du plomb. Parallèlement, un témoin ne contenant que du bouillon MRS et la culture, a aussi été préparé pour la souche à tester. L'incubation est réalisée à 37°C et la croissance bactérienne a été déterminée par mesure de la densité optique à 600 nm entre T_0 et T_{24} h.

La CMI est définie comme la plus faible concentration pour laquelle aucune croissance bactérienne n'a été observée **(Wei *et al.*, 2009).**

II.6 Screening des souches bactériennes produisant des exopolysaccharides

Ce test a été réaliser afin de confirmer la capacité des bactéries lactiques à produire les exopolysaccharides dans le but d'exploiter ces macromolécules dans les processus d'élimination des métaux lourds présents dans l'environnement **(Feng *et al.*, 2012).**

Les souches isolées ont été testés pour leur capacité à produire des EPS sur la gélose hypersaccharosée préalablement coulée et solidifiées dans des boites de Pétri par la méthode des stries puis incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Les isolats EPS positive se caractérisant par des colonies visqueuses ont été sélectionnées pour le test suivant **(Khalil *et al.*, 2018).**

II.7 La production, extraction et quantification des exopolysaccharides

Pour la production des EPS, la méthode décrite par **Abid *et al.*, 2018** a été utilisée avec légères modifications.

1ml des deux isolats choisis à été cultivé dans un erlenmeyer de 200 ml contenant 20 ml de bouillon MRS modifié (le glucose a été remplacé par du lactose) puis incubé à 37 ° C pendant 24h.

Après la période d'incubation, les cellules ont été séparées par centrifugation à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C. Ensuite, une solution d'acide trichloracétique (TCA) a été ajoutée au surnageant pour donner une concentration finale de 4% (poids / volume).

Les protéines précipitées ont été éliminées par centrifugation (12 000 x g pendant 30 min à 4°C). Deux volumes d'éthanol ont été ajoutés au surnageant, agité vigoureusement et maintenu à 4°C pendant une nuit.

L'EPS brut a été recueilli par centrifugation à 15 000 x g pendant 15 minutes à 4°C, puis le culot EPS a été dissous dans l'eau distillée **(Abid *et al.*, 2018).**

La concentration des EPS totaux (exprimé en mg/L) a été estimée dans chaque échantillon par la méthode au phénol-acide sulfurique. Pour cela, 800µl de la solution d'EPS a été mélangé avec 40µl du phénol à 80% et 2ml de l'acide sulfurique. Un blanc a été préparé en utilisant 800µl d'eau distillée à la place de la solution d'EPS. Après incubation dans l'obscurité pendant 15 mn, l'absorbance a été mesurée à 490 nm.

La teneur en EPS de chaque échantillon a été calculée en utilisant la courbe d'étalonnage du glucose (annexe V) **(Chun-lei *et al.*, 2014).** Pour la préparation de cette courbe d'étalonnage, une solution mère du glucose a été préparée (100mg de glucose ont été ajouté à 100ml d'eau distillée).

Pour obtenir une concentration de 1mg/l des dilutions à 10^{-1}, 10^{-2} et 10^{-3} ont être préparé : 10ml de la solution mère a été ajouté à 90ml d'eau distillé, puis 1ml, 2ml, 3ml, 4ml ,5ml,6ml,7ml, 8ml et 9ml de cette concentration ont été ajouté respectivement à 9ml, 8ml, 7ml, 6ml, 5ml, 4ml, 3ml, 2ml et 1ml d'eau distillé. L'absorbance a été mesurée à 490 nm.

Dans notre travail, nous avons choisi de travailler sur le plomb, qui est classée parmi les polluants environnementaux les plus toxiques notamment pour les aliments et l'eau, et de tester la capacité de résistance des bactéries lactiques à ce métal.

I. Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du L'ben :

Dix souches S1, S2, S3, E1, F1, N1, N2, N3, N4 et N5 ont été isolées à partir de quatre échantillons du l'ben.

I.1 Examen macroscopique :

Les résultats macroscopiques se traduisent par l'apparition des colonies bien visibles d'environ 1mm de diamètre, de forme circulaire ou lenticulaire de couleur blanchâtre ou laiteuse avec une surface lisse (Photo 1 et 2).

Sur bouillon, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

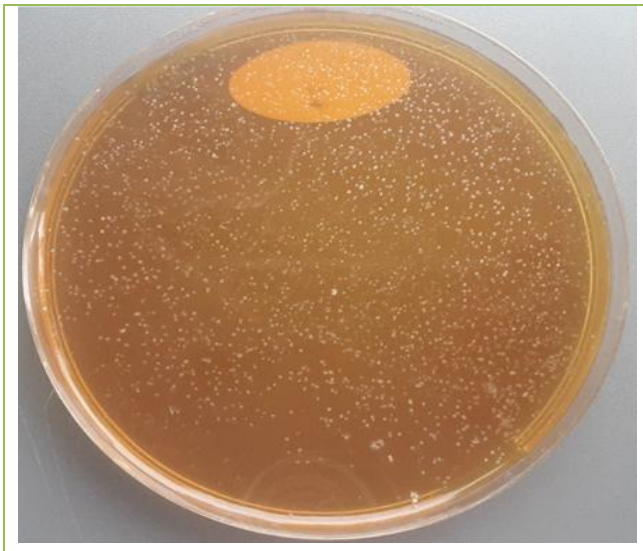

Photo n°1 : L'observation macroscopique des colonies lactique sur gélose MRS.

Photo n°2 : L'observation macroscopique de la bactérie lactique (S3) après purification

I.2 Examen microscopique :

La caractérisation microscopique est basée sur la coloration de Gram (Annexe I), qui a montré que la plupart des souches étudiées sont des bacilles ou coccobacilles en courte chainettes, en paires et parfois isolées (tableau 3), et sont Gram positifs (photos 3 et 4).

Tableau 3: Critères macroscopiques et microscopiques des souches isolés.

Aspect		Aspect macroscopique	Aspect microscopique	
Echantillons	**Code des souches**		**L'aspect**	**Mode de regroupement**
1	**S1**	Colonies circulaires ou lenticulaires de couleur blanchâtre ou laiteuse	bacilles	en paires ou en courtes chainettes
	S2	Colonies circulaires ou lenticulaires de couleur blanchâtre ou laiteuse	bacilles	en paires ou en courtes chainettes
	S3	circulaires ou lenticulaires de couleur blanchâtre ou laiteuse	bacilles	Isolés, en paires ou en courtes chainettes
2	**E1**	circulaires ou lenticulaire de couleur blanchâtre ou laiteuse	bacilles	en paires ou en courts chainettes
3	**F1**	circulaires ou lenticulaires, de couleur blanchâtre ou laiteuse	bacille	Isolés, en paires ou en courtes chainettes
4	**N1**	colonies laiteuses circulaire	coccobacille	Isolés, en paires ou en courtes chainettes
	N2	Colonies laiteuses circulaires	coccobacille	Isolés, en paires ou en courtes chainettes
	N3	colonies laiteuses circulaires	coccobacille	Isolés, en paires ou en courtes chainettes
	N4	colonies laiteuses circulaires	coccobacille	Isolés, en paires ou en courtes chainettes
	N5	Colonies laiteuses circulaires	coccobacille	Isolés, en paires ou en courtes chainettes

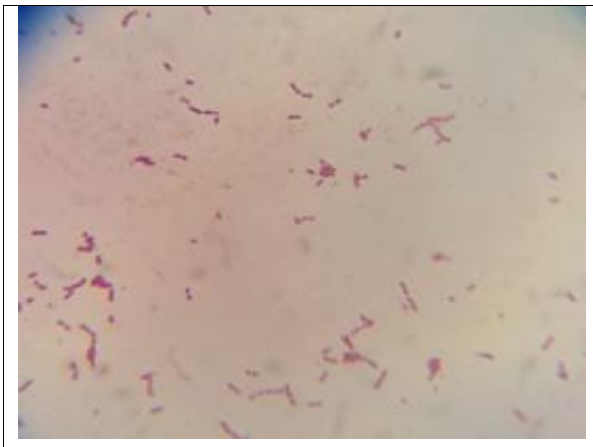	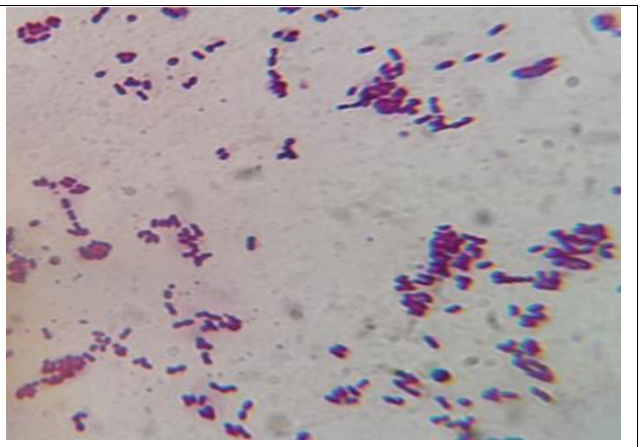
Photo n°3 : Observation microscopique (objectif X100) de la souche N2 après coloration de Gram.	**Photo n°4 :** Observation microscopique (objectif X100) de la souche S3 après coloration de Gram.

II. Tests physiologiques et biochimiques

II.1 Test de catalase

L'absence de dégagement de gaz indique que nos isolats sont catalase négative et que les bactéries lactiques sont incapables de produire l'enzyme catalase qui convertit le peroxyde d'hydrogène en oxygène (O_2) et en eau (H_2O) se qui explique qu'ils n'ont pas besoin d'oxygène pour leur développement.

II.2 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

Les résultats de ce test indiquent que les souches S2, E1, F1, N2 et N5 sont ADH négatives dont le virage du milieu au jaune montre l'absence d'enzyme arginine dihydrolase qui dégrade l'arginine en ammoniac et en citruline alors que les souches S1, S3, N1, N3, N4 sont ADH+ dont la couleur violet due à la production d'ammoniac et la citruline.

II.3 Croissance à différentes températures et thermoresistance

Les résultats de cette étude montrent que toutes les souches testées sont capables de croitre à différentes températures après 24 h d'incubation, ce qui indique que les isolats qui poussent bien à 44°C sont classées comme des thermophiles. Ils résistent aussi à un traitement thermique au bain marie à 60°C pendant 30 mn et 55°C pendant 15mn.

II.4 Types fermentaire

L'absence de gaz dans la cloche de durham, indique que les 10 isolats sont homofermentaires.

II.5 Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl

Toutes les souches isolées sont capables de croitre sur le bouillon MRS avec une concentration de 4%, mais il y a un nombre limité des souches à tester qui n'ont pas pu croitre sur le milieu avec une concentration de 6.5%, c'est le cas des souches N1, N2, N3, N4 et N5 alors que les souches S1, S2, S3, E1, F1 ont la capacité de se développer en présence de cette concentration.

Afin de déterminer les genres bactériens de nos isolats, on a exploité les résultats obtenus figurant dans le tableau 04.

Tableau 04 : Profil physiologique et biochimique des souches isolées.

Caractéristiques	coloration de Gram	catalase	forme	Croissance à différentes températures				ADH	Type de fermentation	Croissance à différentes [NaCl]		Thermorésistance °C	
souche				15	25	30	44			4%	6.5%	55	60
S1	+	-	bacille	+	+	+	+	+	Homo	+	+	+	+
S2	+	-	bacille	+	+	+	+	-	Homo	+	+	+	+
S3	+	-	bacille	+	+	+	+	+	Homo	+	+	+	+
E1	+	-	bacille	+	+	+	+	-	Homo	+	+	+	+
F1	+	-	bacille	+	+	+	+	-	Homo	+	+	+	+
N1	+	-	Cocco-bacille	+	+	+	+	+	Homo	+	-	+	+
N2	+	-	Cocco-bacille	+	+	+	+	-	Homo	+	-	+	+
N3	+	-	Cocco-bacille	+	+	+	+	+	Homo	+	-	+	+
N4	+	-	Cocco-bacille	+	+	+	+	+	Homo	+	-	+	+
N5	+	-	Cocco-bacille	+	+	+	+	-	Homo	+	-	+	+

+ : positif.

- : négatif.

Les résultats de ce tableau nous a permis de classer notre isolats en quatre groupe selon leur caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (tableau 5).

Tableau 5 : classification des souches isolées en fonction de ses caractéristiques morphologiques et physicochimiques

Classe	Souches	Les caractéristiques morphologiques et physicochimiques des souches testées
I	**S2** **E1** **F1**	Bacilles, Gram (+), catalase (-**)**, homofermentaires, ADH (-), poussent à différentes températures et résiste à 4% et 6,5% de NaCl.
II	**S1** **S3**	Bacilles, Gram (+), catalase (-), homofermentaires, ADH (+), poussent à différentes températures, résiste à 4% et 6,5% de NaCl.
III	**N1** **N3** **N4**	Coccobacilles, Gram (+), Catalase (-), Homofermentaires, ADH (+), poussent à différentes températures et à 4 % de NaCl mais pas à 6,5%.
IV	**N2** **N5**	Coccobacilles, Gram (+), catalase (-), homofermentaires, ADH (-), poussent à différentes températures et à 4% de NaCl mais pas à 6,5 %.

D'après les résultats obtenus par **Dib *et al.*, 2012**, **Badis *et al.*, 2005** et **Rizqiati *et al*., 2016** on peut déduire que les souches appartiennent au genre *Lactobacillus*.

III. Screening des souches résistantes au plomb

Après un délai d'incubation de 72h, les mesures de la densité optique sont représentées dans l'annexes III et la résistance des souches est déterminé en exploitant les courbes représentées dans les figures 2, 3, 4, 5,6, 7, 8, 9, 10 et 11.

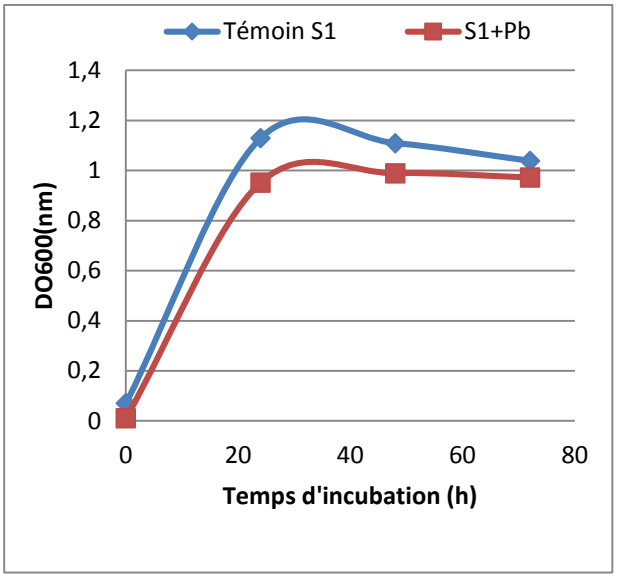

Figure 2 : Croissance de la souche S1 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

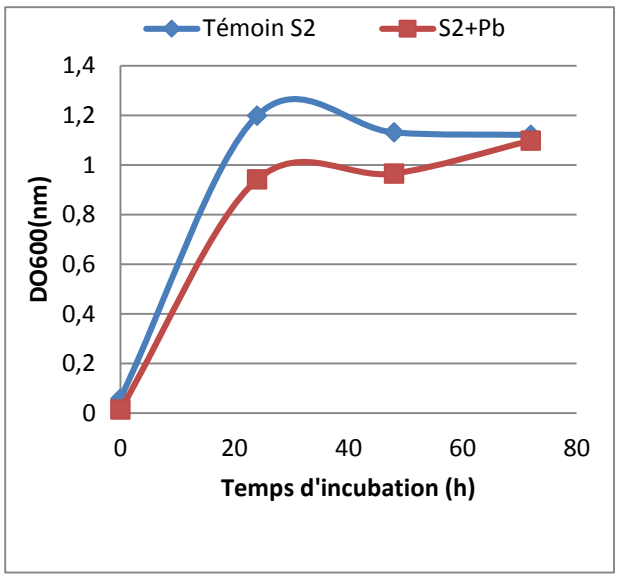

Figure 3 : Croissance de la souche S2 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

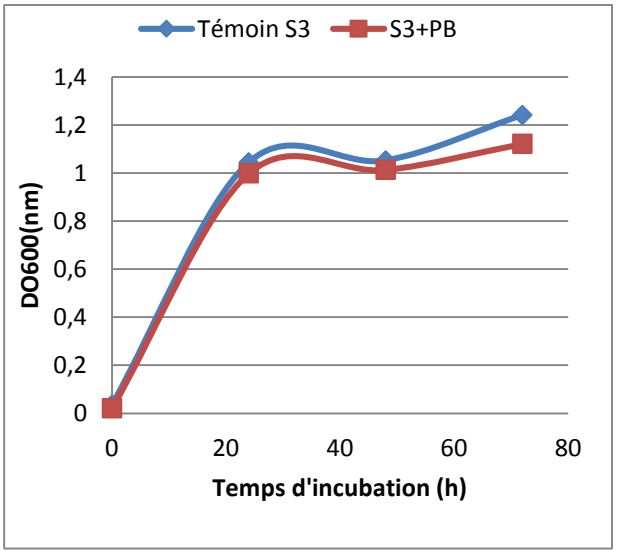

Figure 4 : Croissance de la souche S3 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

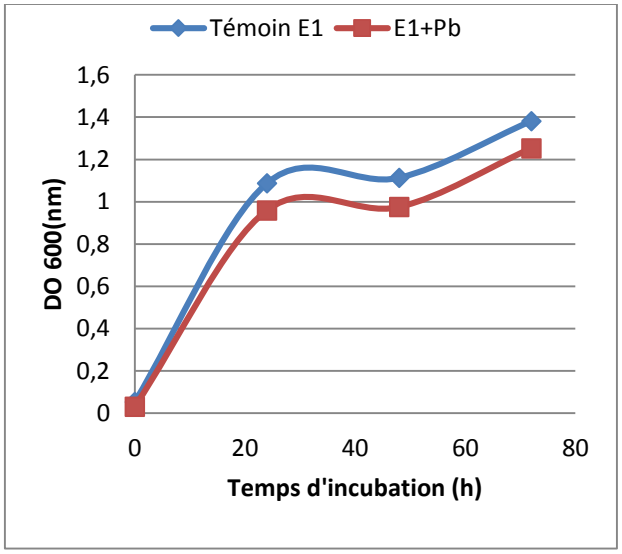

Figure 5 : Croissance de la souche E1 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

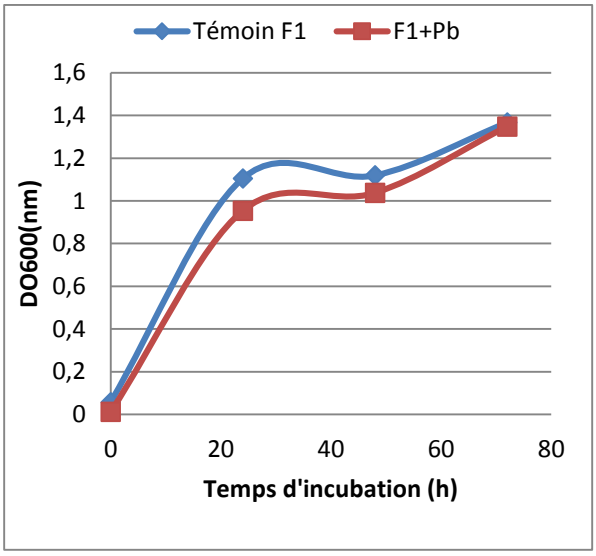

Figure 6 : Croissance de la souche F1 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30 mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

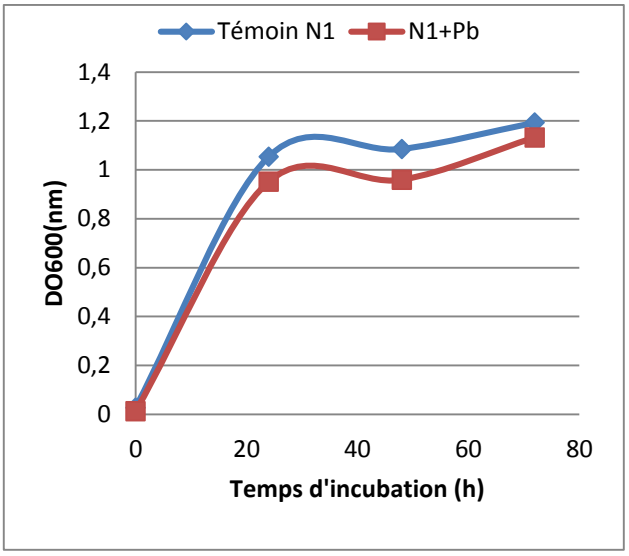

Figure 7 : Croissance de la souche N1 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

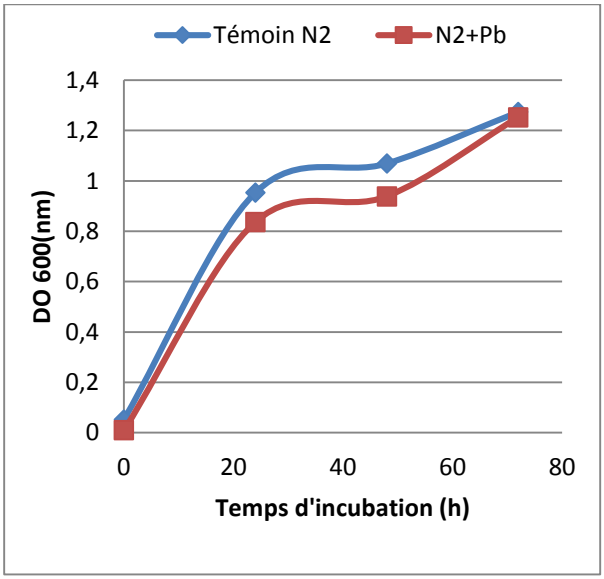

Figure 8 : Croissance de la souche N2 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

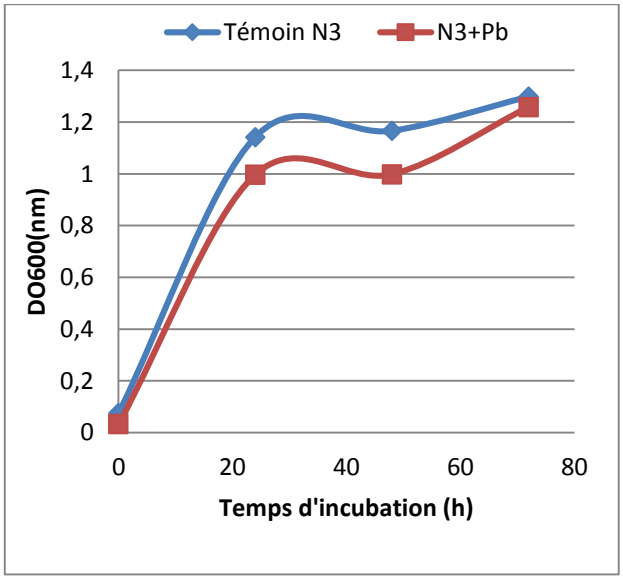

Figure 9 : Croissance de la souche N3 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

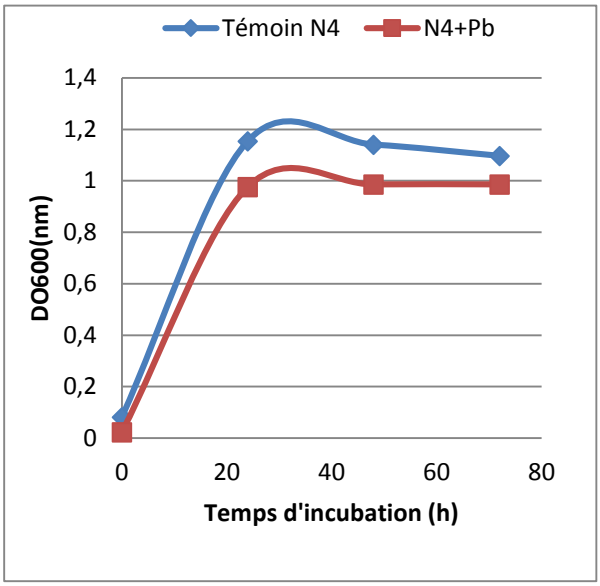

Figure 10 : Croissance de la souche N4 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

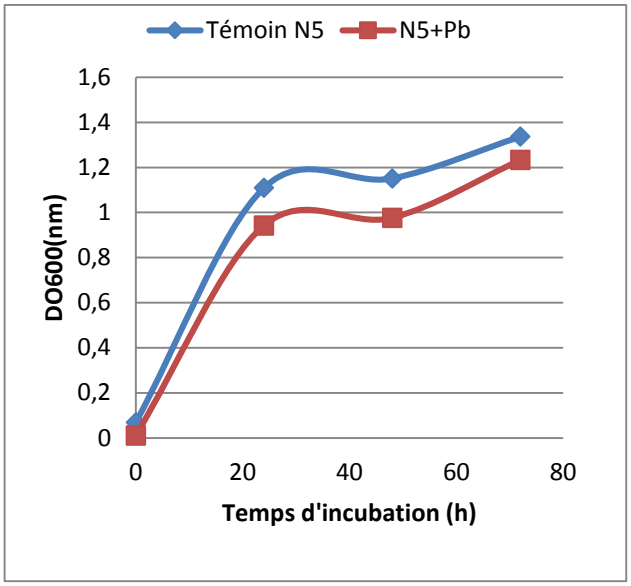

Figure 11 : Croissance de la souche N5 dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du métal incubée à 37 C° pendant 72h.

Les courbes représentées dans les figures 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 montrent l'évolution des biomasses bactériennes (DO à 600nm) des dix souches (S1, S2, S3, E1, F1, N1, N2, N3, N4 et N5) dans le bouillon MRS en présence et en absence de 30mg/l du plomb et en fonction du temps.

A partir de ces courbes nous observons une augmentation progressive de la croissance des souches S1, S2, N4 , S3, E1, F1, N1, N2, N3 et N5, en présence et en absence de 30mg/l du plomb après 24h d'incubation avec un taux de croissance élevé puis la croissances des 10 souche est diminué après 48h à 72h.

Des étude similaire réalisé par Halttunen *et al.*, 2007, trouve 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 50 mg/l de plomb (Pb).

D'autre études ont aussi rapporté que plusieurs souches de *Lactobacillus*: *L. rhamnosus GG, L. rhamnosus LC705, L. johnsonii Lj1, L. casei Shirota* et *L. fermentum ME3* ont la capacité de lier le Pb. De plus, les souches *de L. amylovorus, L. reuteri* et *L. dextrinicus*, isolées à partir d'échantillons de boue et de boue contaminées au Pb, ont été reconnues comme des souches probiotiques éliminant le Pb **(Kirillova *et al.*, 2017).**

D'après ces résultats, on déduit que les 10 souches montrent une résistance à 30mg/l du plomb.

Pour déterminer la souche qui possède une résistance plus élevées au plomb on calcule le taux de croissance spécifique pour chaque souche selon la formule décrite précédemment.

Les résultats du tableau 6 montrent qu'il y a une diminution de la croissance bactérienne des 10 souches en présence et en absence de 30mg/l du plomb de t24 jusqu'à 72h.

Les taux de croissance des 10 souches en présence du plomb est supérieure à celle en absence de ce dernier ce qui montre l'effet du plomb sur la croissance des souches (un ralentissement de la croissance mais pas une inhibition totale).

Le taux de croissance de la souche N2 de 1.6595 était plus élevé que le taux de croissance des souches N1, N3, N4, N5, S1, S2, S3, E1, et F1 pour cela elle a été sélectionnée comme étant la souche la plus résistante en présence de 30mg/l du plomb.

Tableau 6 : Taux de croissance des dix souches.

Taux de Croissance (h-1) / Souches		Après 24h	Après 48h	Après 72h
S1	Témoin	0.6220	0.3055	0.1898
	S1+PB	0.3122	1.8191	1.1912
S2	Témoin	0.8138	0.3827	0.2528
	S2+PB	2.6831	1.568	0.9179
S3	Témoin	1.2082	0.6092	0.4815
	S3+PB	2.0273	1.0289	0.7607
E1	Témoin	0.8220	0.4215	0.3521
	E1+PB	1.2557	0.6386	0.5510
F1	Témoin	0.7552	0.3826	0.3145
	F1+PB	3.4155	1.8588	1.6147
N1	Témoin	1.5266	0.7867	0.1964
	N1+PB	3.0073	1.5171	1.1964
N2	Témoin	0.7110	0.4010	0.3212
	N2+PB	3.3123	1.8601	**1.6595**
N3	Témoin	0.5919	0.3003	0.2261
	N3+PB	1.1943	0.5980	0.5061
N4	Témoin	0.5495	0.2713	0.1734
	N4+PB	1.1759	0.8778	0.5812
N5	Témoin	0.6282	0.3267	0.2551
	N5+PB	3.3746	1.7492	1.4757

IV. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Le profil de résistance de la souche N2 sélectionnée vis-à-vis de différentes concentrations du Pb a été déterminé en mesurant la concentration minimale inhibitrices (CMI) qui nous à permis de déterminer la plus faible concentration qui inhibe la croissance total de la bactérie. Les résultats sont indiqués dans le tableau 7 et la figure 12.

Tableau7 : Valeurs de la densité optique (DO) mesurées à 600nm pour la souche N2 en présence de différentes concentrations du Pb.

Temps / Concentration	T0	T24	T24-T0
50mg/l	0 ,4804	1.4509	0.9705
100mg/l	0,4483	1.4304	0.9821
150mg/l	0.4599	1.3905	0.9306
200mg/l	0.4359	1.3885	0.9526
250mg/l	0.4376	1.3874	0.9498
300mg/l	0.4332	1.3356	0.9024
350mg/l	0.4668	1.3096	0.8428
400mg/l	0.4687	1.2451	0.7764

Les résultats obtenus montrent que l'effet du plomb sur la croissance de la souche N2 varie considérablement en fonction de la concentration du plomb.

En présence de 50mg/l, le plomb n'a eu qu'un faible effet sur la croissance de la souche N2 (1.4509), puis on observe une diminution progressive de la croissance de la souche avec l'augmentation de la concentration du plomb dont la croissance la plus faible a été remarquée à 400mg/l (1.2551).

La différence entre la croissance bactérienne à t_{24} et t_0 en présence de différentes concentrations du plomb montre qu'on n'arrive pas à une concentration minimale dans laquelle le plomb inhibe totalement la croissance bactérienne, ce qui indique que notre souche a un haut degré de résistance au plomb avec une concentration supérieur à 400mg/l et donc elle capable de croitre dans un milieu contenant des concentrations élevées en métal (Pb).

Des études similaire réalisée par Bhakta *et al*., (2012), ont montré que la CMI du plomb (Pb) pour 26 souches de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Enterococcus* est supérieurs à 2000 mg/L.

Les résultats obtenue par Huet *et al.,* 2017, ont montré la capacité de 6 isolats à croitre en présence de différentes concentrations du plomb dont la concentration minimale inhibitrice des espèces de genre *Enterococcus* varies de 30 à 40 ppm alors que la CMI de *Bacillus acidiproducens* est 40ppm.

V.1 Screening des souches bactériennes produisant des exopolysaccharides

Les dix souches sont capables de croitre sur gélose hypersaccharosée dont la production d'EPS se traduit par l'apparition des colonies visqueuses et gluantes (figure 5et 6).

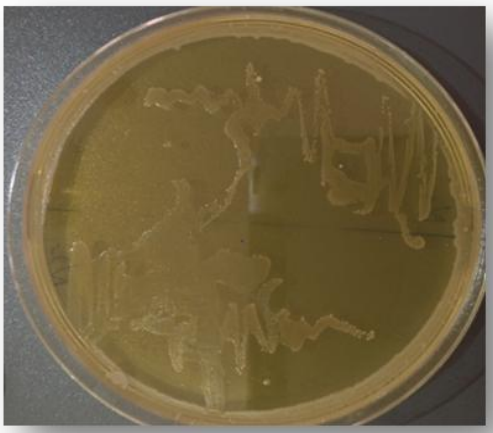

Photo 5 : L'aspect des colonies de la souche N2 sur gélose hypersaccharosée

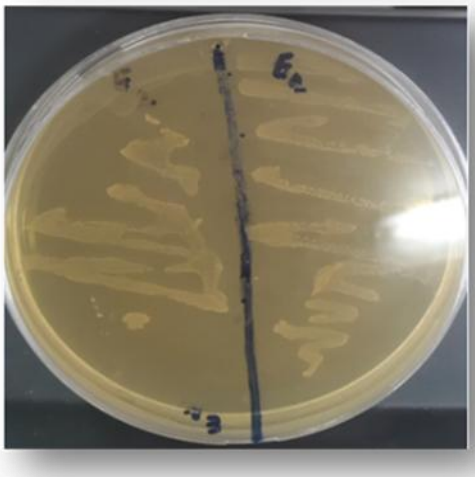

Photo 6 : L'aspect des colonies de la souche F1 sur gélose hypersaccharosée

V.1 Extraction et quantification des exopolysaccharides (EPS)

La quantification des EPS produits a porté sur les souches F1 et N2 qui sont considérées comme des grands producteurs d'EPS (+++) (tableau 8), et d'après les résultats de la quantification (tableau 9), on constate que les deux souches (F1, N2) produisent de grandes quantités d'EPS représentées par les valeurs respectives de 0.01976 g/l et 0.01952 g/l.

Tableau 8 : Mesures de production d'EPS sur gélose hypersaccharosée

Souches	Mesure d'EPS
S1	++
S2	++
S3	++
E1	++
F1	+++
N1	+
N2	+++
N3	+
N4	+
N5	+++

+++ : Production élevée.

++ : Production moyenne.

\+ : Production faible.

Tableau 9: Résultats de la quantification des EPS.

Souche	Evaluation de test	Absorbance (nm)	Quantité (g/l)
F1	+++	**3.9523**	**0.01976**
N2	+++	**3.9074**	**0.01952**

Notre échantillon d'EPS est très concentré ce qui explique les valeurs élevées obtenues lors de la mesure de l'absorbance. Pour obtenir de meilleurs résultats, nous recommandons de réaliser des dilutions.

Nous constatons d'après ces résultats que les deux souches sélectionnées sont capables de produire l'EPS en grand quantité dans les milieux de culture favorable à leurs croissances.

La différence dans la production d'EPS par les microorganismes suggèrent que les quantités d'EPS dépendent de la souche bactérienne et de sa phase de croissance, y compris leur conditions de

culture tels que les sources de carbone, les sources d'azote et les conditions physico-chimiques (c'est-à-dire la température, le pH, le taux d'oxygène, etc.) nécessaires pour leur croissance.

Ismail et Nampoothiri (2010), ont trouvé que la production de EPS par *Lactobacillus plantarum* (MTCC 9510) était 210 mg / L lorsque le milieu a été complété avec 2% saccharose.

De plus, Sanchez, Martinez, Guillén, Jiménez-Diaz et Rodriguez (2006) ont trouvé que la source de carbone a une influence remarquable sur la production d'EPS par *Lactobacillus pentosus* (LPS26) et que l'obtention de 560 mg /l d'EPS a été trouvé en utilisant 30g /L de glucose.

Conclusion

Cette étude a pour but de sélectionner les bactéries lactiques tolérantes au plomb isolées du lait et ses dérivées. Dans la première partie pratique nous avons isolé, purifié et identifié les bactéries lactiques à partir de l'ben. Dans la deuxième partie nous avons testé la capacité de ces isolats à résister en présence de différentes concentrations du plomb dans le milieu. Dans la troisième partie nous avons confirmé la production des exopolysaccharides suivie par des tests d'extraction et de quantification.

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que :

- Les dix souches isolée a partir de différents échantillons de l'ben présentent une résistance remarquable en présences de 30mg/l du plomb.
- La comparaison entre le taux de croissance de dix souches nous a permis de sélectionner la souche la plus résistante au plomb.
- La souche N2 appartenant au genre *Lactobacillus* montre une haute résistance au plomb avec une concentration minimale inhibitrice supérieure à 400 mg/l.
- Les souches N2 et F1 sont capables de produire des quantités élevées des exopolysaccharides.

La capacité des bactéries lactiques à tolérer la présence des concentrations très élevé au plomb dans le milieu doit être exploitée dans le domaine environnemental et surtout dans les processus de bioremediation des métaux lourds afin de diminuer leur risque pour les êtres vivants.

Références bibliographiques

A

Abatenh E., Gzaw B., Tsegaye Z et Wassie M., **(2017).** The role of microorganisms in bioremediation –Areview. *Open journal of environmental biology* 2 (1): 038-046.

Abdullahi M.S., (2013). Toxic effects of lead in humans: an overview. *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology* 2(6): 157-162.

Abid Y., Casillob A., Gharsallaha H *et al.*, (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharidesfrom newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International journal of biological macromolecules* 108 : 719-728.

Ahirwar S.S., Gupta G., Singh V et Gupta V., (2017). Comparative study of lactobacillus species in dental caries active subjects. *Asian Journal of Science and Technology* 08(10): 5986-5991.

Allam N.G, Mali E.M, Shabanna S et Elsayed A.E., (2015). The role of probiotic bacteria in removal of heavy metals. *Egyptian Journal of Environmental Research* 3: 1- 11.

Alloway B.J., (**1995).** Soil processes and the behaviour of heavy metals. *In Alloway .B. j.(Ed).Heavy metals in soils* 11-35.

Arif T.J., Mudsser A., Kehkashan S., Arif A *et al.*, (2015). Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *International journal of molecular sciences* 16 :29592–29630.

Arimah B.D., Ogunlowo O.P., (2014). Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Nigerian Foods: Medical Importance and Comparison of Their Bacteriocins Activities. *Journal of Natural Sciences Research* 4(23).

Aryal M et Liakopoulou.K M., (**2014).** Bioremoval of heavy metals by bacterial. *Biomass Environmental Monitoring and Assessment* 187: 3- 26, 4173.

B

Badis A., Guetarnib D., Moussa.B B., Hennic D.E., Tornadijod M.E et Kihal M., (**2004).** Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology* 21: 343–349.

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.

C

Carocci A., Catalano A., Lauria G., Sinicropi S.M., **Genchi G., (2016).** Lead Toxicity, Antioxidant Defense and Environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 238:123.

Chun Lei Z., Jia qi L., Hai tao G., Jie W et Ri hua X., (2014). Lactic acid bacteria isolates from traditional yoghurt. *Mljekarstvo* 64 (4) :254-260.

Cyraniak.E et Draszawka.B B., (**2014).** Heavy metals in circulation biogeochemical. *World Scientific News* 6 :30-36.

D

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

Das N., Vimala R et Karthika P., (2008). Biosorption of heavy metals-an overview. *Indian journal of biotechnology* 7:159-169.

Dib H., Hajj seamaan R., Mrad R *et al.*, (2012). Identification Et Evaluation De L'effet Probiotique Des Bacteries Lactiques Isolées Dans Des Fromages Caprins Traditionnels. *Lobanese Science Journal* 13 (1).

Donati E.R., (2018). Heavy Metals In The environment microorganisms and bioremediation. Boca Raton, FL : CRC Press, Argentina. 3-73.

Dowlatshahi S., Torbati A.R.H et Loloei M., (2014). Adsorption of copper, lead and cadmium from aqueous solutions by activated carbon prepared from saffron leaves. *Environmental Health Engineering and Management Journal* 1(1): 37–44.

Drouault S et Corthier G., (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research* 32 (2): 101-117.

E

Egbe J.G., Lennox J.A., Rao P., Anitha et **Umoafia G.E., (2017).** Lactic Acid Bacteria Profile of Fermenting Cucumber in 7% Brine Solution. *Journal of Advances in Microbiology* 3(1): 1-8.

Elbossaty W.F., (2017), Toxicology, Biological Activity, Synthesis, and Anti-Microbial Effects of Lead Nanoparticles. Journal Of Medical Physics And Applied Sciences 2: 2- 4.

F

Fahr M., Laplaze et Bendaou N *et al.*, (**2013).** Effect of lead on root growth. *Frontiers In Plant Science* 4: 175.

Fazal H., (**2015).** A mini review on lead (Pb) toxicity in plants. *Journal of Biology and Life Science* 6(2): 2157-6076

Feng M., Chen X., Li C., Nurgul R et Dong M., (2012). Isolation and Identification of an Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacterium Strain from Chinese Paocai and Biosorption of Pb(II) by Its Exopolysaccharide. *Journal of Food Science* 77 (6).

Flora G., Gupta D et Tiwari A., (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology* 5(2): 47–58.

G

Gabr R.M., Hassan S.H.A et Shoreit A.A.M., (2008). Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62: 195–203.

Goyal P., Belapurkar P et Kar A., (2017). A Comparative Review on Potential Role of Environmental Species and Proven Probiotic Species of Genus Bacillus in Bioremediation of Heavy Metals with Special Emphasis on Chromium and Lead. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 43(1) 29: 144-154.

Gunatilake S.K., (2015). Methods of Removing Heavy Metals from Industrial Wastewater. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science Studies* 1:1.

H

Halttunen T., Alminen 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.

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

I

Ianieva O.D., (2009). Heavy Metal Resistance Mechanisms In Bacteria (Translation From Russian). *Journal of microbiology 71(6):54:65.*

Idoui T et karam N.D., (2008). The role of probiotic bacteria in removal of heavy metals. *Egyptian Journal of Environmental Research* 3: 1- 11

Igwe. J. C et Abia A.A., (2006). A bioseparation process for removing heavy metals from waste water using biosorbents, *African Journal of Biotechnology* 5 (12): 1167-1179.

Ismail B et Nampoothiri K.M., (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic Lactobacillus plantarum MTCC 9510. *Archives of Microbiology* 192: 1049–1057.

J

Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B.B., Beeregowda K.N., (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* 7(2): 60–72.

Jarosławiecka A et Piotrowska.S Z., (2014). Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology* 160: 12–25.

K

Khalil E.S., Manapa M.Y., Mustafac S., Amida M., Alhellie A.M et Aljouborif A., (2018). Probiotic characteristics of exopolysaccharides-producing Lactobacillus isolated from some traditional Malaysian fermented foods. *Cyta – Journal Of Food* 16 (1): 287–298.

Kinoshita H., Sohma Y et Ohtake F., (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology* 164: 701-709.

Kirillova A.V., Danilushkina A.A., Irisov D.S *et al.*, (2017). Assessment of Resistance and Bioremediation Ability of Lactobacillus Strains to Lead and Cadmium. *International Journal of Microbiology* 2017(4): 1-7.

König H., Frohlich J., Unden G., (2009). Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 522.

Kosek.H K., Panocha B., Śliwa A., (2017). Heavy metals – a silent threat to health. *Journal of Education, Health and Sport* 7(1): 121-132.

L

Lin D., Ji R., Xiao M *et al.*, (2017). The research progress in mechanism and influence of biosorption between lactic acid bacteria and Pb(II): a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1549-7852.

Liu W., Pang H., Zhang H et Cai Y., (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. *Springer Science+Business Media Dordrecht* 66:353.

M

Monachese M., Burton J.P., Reid G., (2012). Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals throughMicrobial Processes: a Potential Role for Probiotics. *Applied and environmental Microbiology* 78(18): 6397–6404.

Mrvcic J., Stanzer D., Solic E., Stehlik.T 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.

Munees A.,(2012). Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation : a review. *Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology Journal* 3: 39–46.

Murthy S., Bali G et Sarangi S.K., (2012). Biosorption of Lead by Bacillus cereus Isolated from Industrial Effluents. *British Biotechnology Journal* 2(2): 73-84.

N

Naik M.M et Dubey S.K., (2013). Lead resistant bacteria : Lead Resistance Mechanisms,their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and environmental safety* 98 :1-7.

Nouri M et Haddioui A., (2016). Les techniques de dépollution des sols contaminés par les métaux lourds: une revue (The remediation techniques of heavy metals contaminated soils: a review). *Maghrebian Journal of Pure and Applied Science* 2(2): 47- 58.

O

Oves.M., Saghir.K M., Huda Qari H.A., Nadeen.F M et Almeelbi T., (2016). Heavy Metals: Biological Importance and Detoxification Strategies. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* 7(2): 2155-6199.

P

Patel A., Sv A., Shah N et Verma D.K., (2017). Lactic Acid Bacteria As Metal Quenchers To Improve Food Safety And Quality. *AgroLife Scientific Journal* 6 (2).

Patra M., Bhowmik N., Bandopadhyay B et Sharma A., (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 52: 199–223

Perpetuo E.A., Souza C.B *et al.*, (**2011).** Engineering Bacteria for Bioremediation. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering From Analysis and Modeling to Technology Applications 1: 646

Pinho S et Ladeiro B., (2012). Phytotoxicity by Lead as HeavyMetal Focus on Oxidative Stress. *Journal of Botany* 2012: 10.

Prathiksha P., Prabhu P.P., Prabhu B., (2018). A Review on Removal of Heavy Metal Ions from Waste Water using Natural/ Modified Bentonite. *Matec Web of Conferences* 144 (13).

R

Raikwar M.K., Kumar P., Singh M et Singh A., (2008). Toxic effect of heavy metals in livestock health. *Veterinary World* 1(1): 28-30.

Raut P.A., Chahande A et Moharkar Y., (2015). Various techniques for the removal of Chromium and lead from Waste water:Review. *International Journal of Emerging Trends in Engineering and Basic Sciences* 2: 64-67.

Rizqiati H., Nurwantoro., Mulyani S et Febrisiantosa A., (2016). Isolation and identification of lactic acid bacteria from pampangan buffalo milk of south sumatera indonesia. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences* 2 (4): 01-12.

S

Sabine Martin S., Griswold W., (2009). Human Health Effects of Heavy Metals. *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens* 15 :1-6.

Sadi F., (2017). Isolement et identification des souches des bactéries lactiques à caractère technologique et probiotique. Thèse de doctorat université Hassiba Benbouali Chlef.

Sánchez J.I., Martínez B., Guillén R., Jiménez-Díaz R et Rodríguez A., (2006). Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by Lactobacillus pentosus LPS26. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7495–7502.

Sharma P et Dubey R.S., (2005). Lead Toxicity In Plant. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1): 35-52.

Sharma S., Rana S., Thakkar A., Baldi A., Murthy R.S.R et Sharma RK., (2016). Physical, Chemical and Phytoremediation Technique for Removal of Heavy Metals. *Journal of Heavy Metal Toxicity and Diseases* 1(2) :10.

Singh J et Kalamdhad A. S., (2011). Effects of Heavy Metals on Soil, Plants, Human Health and Aquatic Life. *International Journal of Research in Chemistry and Environment* 1(2): 15-21.

Soro G., Soro B.S., Soro N *et al.*, (**2009).** Métaux lourds (Cu, Cr, Mn et Zn) dans les sédiments de surface d'une lagune tropicale africaine : cas de la lagune Ebrie (Côte d'Ivoire). *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 3(6): 1408-1427.

Spain A et Alm E., (2003). Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the environment. *Reviews in Undergraduate Research* 2: 1-6

Srivastava D., Singh A et Baunthiyal M., (**2015).** Lead Toxicity and Tolerance in Plants. *Journal of Plant Science& Research* (2): 123.

T

Tangahu B.V., Abdullah S.R.S., Basri H., Idris M., Anuar N et Mukhlisin M., (2011). A Review on HeavyMetals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering* 2011: 31.

W

Wani A.L et Ara A., (2015). Usmanij.a.lead toxicity a review. *Interdisciplinary toxicology* 8(2): 55-64.

Wei G., Fan L., Zhu W., Fu y., Yu J et Tang M., (2009). Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWRS33-2 isolated from root nodule of Lespedeza cuneata in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials* 162: 50–56.

Wierzba S., (**2015).** Removal Of Cu (II) And Pb (II) From Aqueous Solutions By Lactic Acid bacteria. *Proceedings of Ecopole* 9(2): 059.

Wuana R.A et Okieimen F.E., (**2011).** HeavyMetals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *International Scholarly Research Network* 2011: 20.

X

Xiao S., Yi L., Quanfa Z et Weibo W., (2011). Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of Jatropha curcas L. *Environmental Science and Pollution Research 11-625*

Y

Yaghoobizadeh F., Ardakani.M.R et Zolgharnein H., (2017). Isolation, screening and identification of the best selenium-reducing bacteria and study on the sorption mechanism. *Environmental and Experimental Biology* 15: 161–171.

Yi Y.J., Lim J.M., Gu S *et al.*, (2017). Potential use of lactic acid bacteria Leuconostoc mesenteroides as a probiotic for the removal of Pb(II) toxicity. *Journal of Microbiology* 55 (4) 296–303.

Z

Zabochnicka.Ś M et Krzywonos M., (2014). Potentials of Biosorption and Bioaccumulation Processes for Heavy Metal Removal. *Polish Journal of Environmental Studies* 23 (2) : 551-561.

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

Zarour K., Benmechernene Z et Hadadji M., (2012). Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de Leuconostoc mesenteroïdes isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie, *Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques* 08 39 : 47.

Zoghi A., Khosravi.D K et Sohrabvandi S., (2014). Surface Binding of Toxins and Heavy Metals by Probiotics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 14: 84-98.

Annexes

Annexe I:

Coloration de Gram.

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à l'objectif(x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif enrose.

Annexe II :

Composition des milieux de culture.

1. **Milieux solide**

1.1 Gélose MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960) :

Extrait de levure 5g

Extrait de viande 5g

Peptone .....10 g

Acétate de sodium.....5g

Citrate de sodium 2g

Glucose 20g

KH_2PO.....2g

MgSO4.....0.1g

MnSO4.....0.05g

Agar.....12g

Tween80 ..... 1 ml

Eau distillée q.s.p ..... 1000 ml

pH= 6.5±0.2 à 37 °C Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

1.2 Gélose hypersaccharosée

Extrait de viande 10g

Extrait de levure 3g

Peptone 2.5g

Saccharose 150g

K2HPO4 ..... 2g

NaCl.....:..... 1g

MgSO4, 7H2O 0.2g

Agar 15g

Eau distillée qsp 1000ml

pH= 6,8

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

2. Milieu liquide :

2.1 Bouillon MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960) :

Peptone 10g

Extrait de viande 8g

Extrait de levure 4g

Glucose 20g

Acétate de sodium trihydraté 5,0g

Citrate d'ammonium 2,0g

KH_2PO4.....2g

Tween 80 ..... 1,0 ml

Hydrogénophosphate de potassium 2,0g

Sulfate de magnésium heptahydraté 0,2g

Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05g

pH = 6.2

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

2.2 bouillon MRS modifiée

Peptone 10g

Extrait de viande 8g

Extrait de levure 4g

Lactose..... 4g

Acétate de sodium trihydraté 5,0g

Citrate d'ammonium 2,0g

Tween 80 ..... 1,0 ml

Hydrogénophosphate de potassium 2,0g

Sulfate de magnésium heptahydraté 0,2g

Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05g

pH = 6.2

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Annexe III : Les tableaux

Tableau 1 : Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche S1 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

S1	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0708	1.1294	1.1093	1.0388
DO (S1+Pb)	0.0112	0.9512	0.9892	0.9718

Tableaux 2 : Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche S2 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

S2	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0584	1.199	1.1313	1.1214
DO (S2+Pb)	0.0144	0.9417	1.0986	0.96611

Tableau 3 : Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche S3 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

S3	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0348	1.0439	1.0524	1.2414
DO (S3+Pb)	0.0201	0.9981	1.0128	1.1210

Tableau 4 : Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche E1 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

E1	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0524	1.0865	1.1127	1.3811
DO (E1+Pb)	0.0308	0.9590	0.9749	1.2528

Annexes

Tableau 5 : Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche F1 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

F1	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0578	1.1054	1.1193	1.3669
DO (F1+Pb)	0.0115	0.9542	1.0376	1.3485

Tableau 6 : Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche N1 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

N1	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0280	1.0539	1.0854	1.1933
DO (N1+Pb)	0.013	0.9513	0.9597	1.1329

Tableau 7 : Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche N2 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

N2	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0528	0.9539	1.0693	1.2739
DO (N2+Pb)	0.0104	0.8373	0.9390	1.2531

Tableau 8: Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche N3 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

N3	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0751	1.1420	1.1661	1.2982
DO (N3+Pb)	0.0336	0.9967	0.9982	1.2580

Tableau 9 : Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche N4 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

N4	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0813	1.1536	1.1402	1.0966

DO (N4+Pb)	0.0230	0.9757	0.9922	0.9856

Tableau 10 : Les valeurs de la Densité optique à mesurée à 600nm de la souche N5 en présence de 30mg/l incubée à 37 °C pendant 72h.

N5	**0**	**24**	**48**	**72**
DO (témoin)	0.0690	1.1094	1.1513	1.3365
DO (N5+PB)	0.0115	0.9429	0.9771	1.2334

Annexe IV :

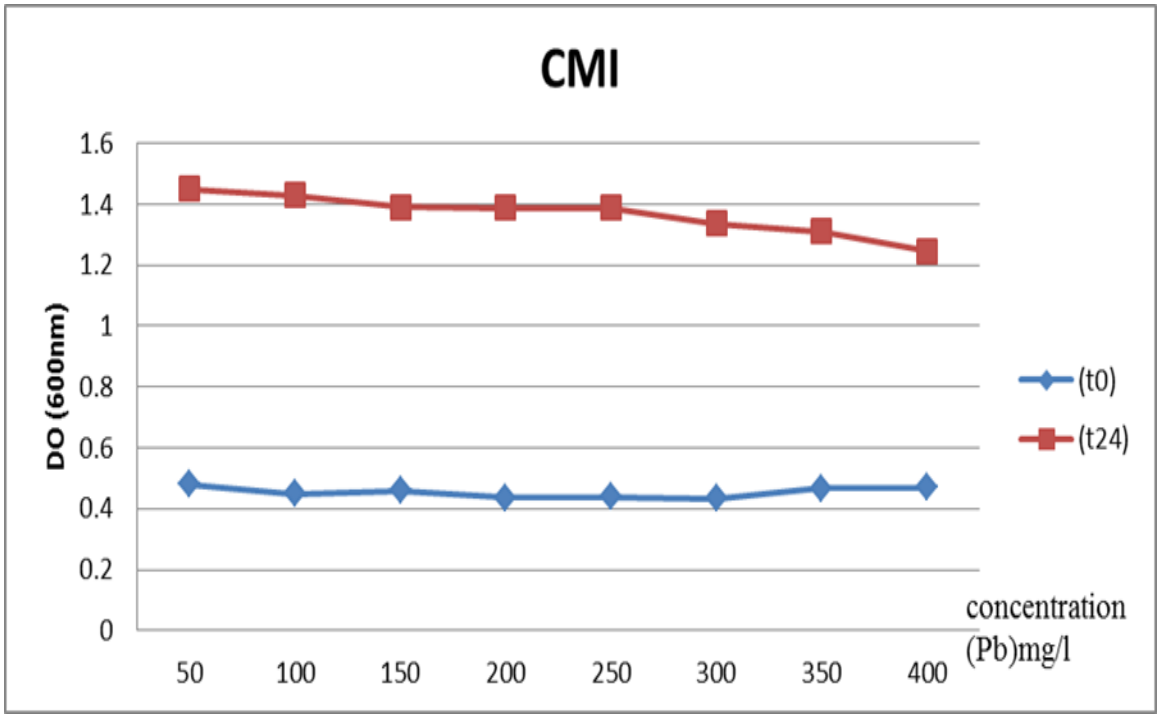

Figure 12 : La concentration minimale d'inhibitrice mesurée à 600nm de la souche E2 en fonction de la concentration du plomb.

Annexe V :

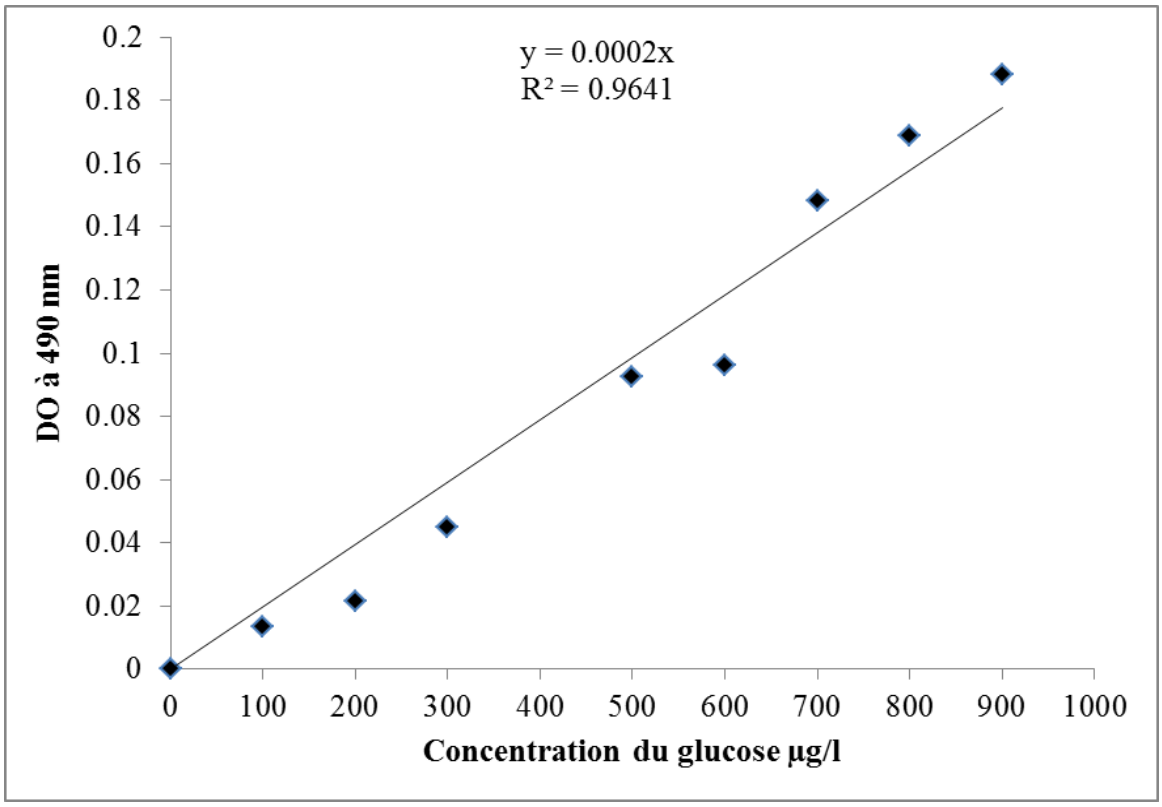

Figure 1 : Courbe d'étalonnage du glucose.

Présentée par : ***Fortas Souad*** ***Sebbat Fadila***	**Présidente : M^me^ *Benhamada Wahiba*** **Examinatrice : Dr. *Oulad Haddar Houria*** **Encadreur : M^me^ Roula *Sagia***

Screening des bactéries lactiques tolérantes au plomb isolées du lait et dérivés

Sommaire

L'eau, l'air et diverses sources de nourriture sont les plus susceptibles d'être contaminés par le plomb métallique. Ce dernier est considéré l'un des contaminants environnementaux cumulatifs, affectant tous les systèmes biologiques. De nombreuses études scientifiques ont démontré la capacité de certains microorganismes à résister en présence de différentes concentrations de ces polluants et à purifier notre environnement.

Le but de cette étude est d'isoler des bactéries lactiques et d'étudier leur capacité à résister au plomb. Dans notre travail, nous avons isolé dix souches de bactéries lactiques et après avoir testé leur capacité à résister au plomb, nous avons sélectionné une souche en fonction de leur taux de croissance afin de déterminer sa concentration minimale inhibitrice, cette souche a été cultivé avec différentes concentrations du plomb. Les résultats de cette étude montrent la capacité de la souche N2 à résister en présence de concentrations élevées du plomb dépassant 400 mg/l par litre.

Mots-clés : Plomb, microorganismes, Bactéries lactiques, résistance, Concentration Minimale inhibitrice.

Abstract :

Water, air and various food sources are more likely to be contaminated with lead metal. This latter is considered as one of the largest cumulative environmental contaminants that affect all biological systems .Many scientific studies have demonstrated the ability of some microbes to resist in presence of different concentrations of these pollutants and to purify the environment. The aim of this study is to isolate the lactic acid bacteria and study their ability to resist lead metal. In our work, we isolated ten strains of lactic acid bacteria and after testing their ability to resist lead we were able to select one strain depending on their growth rate in order to determine the minimum inhibitory concentration by cultivated them with different concentrations of lead. The results showed the ability of this strain to resist high lead concentrations exceeding 400 milligrams per liter.

Keywords: lead, microorganisms, lactic acid bacteria, resistance, low concentration inhibitor.

ملخص

يعتبر الماء، الهواء ومختلف مصادر الطعام اكثر عرضة للتلوث بالرصاص المعدني. اذ يعتبر هذا الاخير واحد من اكبر الملوثات البيئية التراكمية الذى يؤثر على جميع الانظمة البيولوجية. وقد اثبتت العديد من الدراسات العلمية قدرة بعض الكائنات الحية على مقاومة تراكيز مختلفة من هذه الملوثات و تطهير بيئتنا.

الهدف من هذه الدراسة هو عزل بكتيريا حمض اللبن و دراسة قدرتها على مقاومة معدن الرصاص

في عملنا هذا، قمنا بعزل 10 سلالات من بكتيريا حمض اللبن وبعد اختبار قدرتها على مقاومة الرصاص تمكنا من اختيار سلالة واحدة اعتمادا على سرعة نموها من اجل تحديد التركيز الادنى المثبط لها من خلال زرعها مع تراكيز مختلفة من الرصاص.

اظهرت النتائج قدرة هده السلالة على مقاومة تراكيز عالية من الرصاص تفوق 400 ميليجرام على اللتر.

الكلمات المفتاحيـــــــــــة :الرصاص، الميكروبات ،بكتيريا حمض اللبن، المقاومة، التركيز الادنى المثبط.