

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Microbiologie Appliquée
et Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية
و علوم التغذية

Mémoire de fin d'études

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

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'effet de quelques paramètres sur
l'élimination du chrome hexavalent par
*Bacillus megaterium***

Membres du Jury

Présidente : M^{me} Samya Amira
Examinatrice : M^{me} Ghania Bourzama
Encadreur : Dr. Houria Ouled Haddar

Présenté par :

Dounia Rouibah
Selma Hafsaoui

Année Universitaire 2016-2017

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciement

Nous tenons en premier lieu à remercier Allah qui nous a donné la volonté pour étudier et réalisé ce travail.

Le grand merci à notre encadreur Dr Ouled Haddar Houria, qui a fait pour nous un travail supplémentaire et nous a guidé lors de l'élaboration de ce travail avec ses encouragements, sa patience et ses conseils judicieux, nous la prions d'accepter nos sincère remerciements, notre profond respect et entiers dévouement.

Nous remercions également M^{me} Amira Samia pour l'honneur qu'il nous a fait de présider ce jury et M^{me} Bourzama Ghania voir accepté d'examiner ce travail.

Le professeur Sifour Mohamed qui nous aidé au cours de ce travail et on les remercie de leurs remarques et de leurs conseils toujours très utiles.

Nos remerciements sont dus à l'ensemble du personnel de laboratoire de microbiologie

Un grand merci à nos familles, à nos chers parents qui nous ont soutenus durant toutes ses années d'études et qui nous ont encouragés sans cesse, nos frères et sœurs, tous les amis et surtout les étudiants de Master II promotion 2016/2017.

Dounia et Selma

SOMMAIRE

Sommaire	I
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VI
Introduction	1
Partie bibliographique	
I. Historique	3
II. Le chrome: propriétés, source et toxicité	3
II.1. Propriétés physico-chimiques du chrome	3
II.1.1. Propriétés physique.....	3
II.1.2. Propriétés chimiques	4
II.1.2.1. Le chrome trivalent	4
II.1.2.2. Le chrome hexavalent	5
II.2. Les sources de chrome	5
II.2.1. Les sources naturelles	5
II.2.2. Les sources anthropiques	5
II.2.2.1. Industries métallurgiques	5
II.2.2.2. Industries chimiques	5
II.2.3. Autres sources	6
II.3. Toxicité du chrome	6
II.3.1. Chez l'Homme et les animaux	6
II.3.2. Chez les microorganismes	8
II.3.3. Chez les végétaux	8
III. Procèdes d'élimination du chrome	9
III.1. Les procédés physico-chimiques	9
III.1.1. Osmose inverse	9
III.1.2. Echange d'ions	9
III.1.3. Précipitation chimique	9
III.1.4. Electrocinétique	10
III.1.5. Adsorption	10

III.2. Les procédés biologiques	11
II.2.1. La biosorption	11
II.2.2. Biofilms dans les bioréacteurs	11
II.2.3. Cellules immobilisées	12
II.2.4. Bioréacteur utilisant des microorganismes vivants	12
IV. Résistance microbienne au chrome et mécanismes de réduction	12
IV.1. Résistance microbienne au chrome	12
IV.1.1. Mutation du système de transport du sulfate	14
IV.1.2. Système d'efflux : la protéine ChrA	14
IV.1.3. La réduction extracellulaire du Cr (VI)	15
IV.2. La réduction biologique	15
IV.2.1. La réduction par les bactéries	15
IV.2.1.1. Mécanisme direct	15
▪ Aérobie	15
▪ Anaérobie	16
IV.2.1.2. Mécanisme indirect	17
IV.2.2. La réduction par les champignons et les levures	17
Matériel et méthodes	
I. Matériel	18
I.1. La souche bactérienne	18
I.2. Milieux de culture	18
I.3. Produits chimiques et réactifs	18
I.4. Appareillage	18
II. Méthodes	19
II.1. Revivification de la souche	19
II.2. Préparation de la solution mère des métaux lourds	19
II.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI	19
II.4. Effet de quelques paramètres sur la croissance et la réduction du chrome	20
II.4.1. Effet du pourcentage de l'inoculum	20
II.4.2. Effet du pH	20
II.4.3. Effet de l'agitation	21
II.5. La bioaccumulation par la souche bactérienne	21
II.6. Méthode colorimétrique de dosage du chrome (VI)	21

II.6.1. Préparation de la solution acide de diphénylcarbazide (DPC)	22
II.6.2. Etablissement de la courbe d'étalonnage du chrome (VI)	22
II.6.3. Mode opératoire	22
II.6.4. Calcul du taux de réduction du chrome(VI)	22
Résultats et discussion	
I. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	23
II. Effet de quelques paramètres sur la croissance et la réduction du chrome	25
II.1. Effet de la biomasse	25
II.2. Effet du pH	28
II. 3. Effet de l'agitation	30
III. Bioaccumulation du chrome (VI)	32
Conclusion	34
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des abréviations

BSR	Bactéries sulfito-réductrices
BRI	Bactéries réductrices de fer
BN	Bouillon nutritif
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Cd (II)	Cadmium
Cr (VI)	Chrome hexavalent
DPC	Diphénylcarbazine
Fer (II)	Chlorure ferreux
Fer (III)	Chlorure ferrique
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GN	Gélose nutritive
Hg (II)	Mercure
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Pb (II)	Plomb
ppm	Partie par million
PVA	Poly (acétate de vinyle)
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
rpm	Rotation par minute
LB	bouillon lysogène

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Diagramme de toxicité et mutagenicité du chrome hexavalent.	7
Figure 2 :	Mécanismes de résistance du chromate dans les cellules bactériennes.	13
Figure 3 :	Mécanisme enzymatique de réduction du chrome hexavalent en aérobiose.	16
Figure 4 :	Effet des différents pourcentages d'inoculum de <i>Bacillus megaterium</i> (A3-1) sur sa croissance en présence de 30 mg/L de Cr (VI) dans le bouillon nutritif à 37°C.	25
Figure 5 :	Effet des différents pourcentages d'inoculum de <i>Bacillus megaterium</i> (A3-1) sur l'élimination du Cr (VI) en présence d'une concentration initiale 30 mg/L à 37°C en fonction de temps.	27
Figure 6 :	Effet des différents valeurs de pH sur la croissance de <i>Bacillus megaterium</i> en présence d'une concentration de 30 mg/L de Cr (VI) dans le bouillon nutritif à 37°C.	28
Figure 7 :	Effet des différents valeurs de pH sur l'élimination du Cr (VI) en présence d'une concentration initiale 30 mg/L à 37°C en fonction de temps	29
Figure 8 :	Effet de l'agitation sur la croissance de <i>Bacillus megaterium</i> en présence d'une concentration de 30 mg/L du Cr (VI) dans le bouillon nutritif à 37°C.	30
Figure 9 :	Effet de l'agitation sur l'élimination du Cr (VI) en présence d'une concentration initiale de 30 mg/L à 37°C en fonction de temps.	31
Figure 10 :	Dosage du Cr intracellulaire dans la souche <i>Bacillus megaterium</i> (A3-1) en présence de 30 mg/L de Cr dans le bouillon nutritif après 72h d'incubation à 37°C.	32

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Principales caractéristiques physiques du chrome.	4
Tableau II :	Majeurs effets physiologiques du chrome chez l'homme.	7
Tableau III :	Inconvénients de quelques méthodes conventionnelles.	10
Tableau IV :	Valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour la culture <i>Bacillus megaterium</i> (A3-1) en présence diffèrent concentration de Pb, Hg et Cr (VI).	23

Le problème de l'environnement contaminé est aujourd'hui très préoccupant pour les pays émergents (**Mishra et Bharagava, 2016**). Les métaux lourds tels que le plomb, le mercure, le cuivre, le zinc et le chrome, ...etc. ne peuvent pas être biodégradés et donc persistent dans l'environnement pendant de longues périodes. De plus, ils sont continuellement ajoutés dans le milieu par diverses activités. L'accumulation des métaux lourds dans l'environnement peut se répercuter sur la santé des êtres humains et des animaux. A l'échelle microscopique, les métaux lourds ont aussi des effets néfastes sur les populations bactériennes, et par conséquent sur le fonctionnement de l'écosystème (**Nhari et al., 2014**).

L'industrialisation rapide a un impact significatif sur la qualité des écosystèmes en raison des décharges énormes de métaux lourds (**Thatheyus et Ramya, 2016**). L'industrie de tannerie peut être perçue comme un processus qui utilise les déchets potentiels des abattoirs pour produire du cuir. Cependant, les conséquences environnementales du processus de tannage sont cruciales, à cause de la production de quantités significatives d'effluents riches en chrome (**Aboulhassan et al., 2008**).

Le chrome est l'un des métaux les plus utilisés dans divers procédés industriels tels que la production d'acier, la fabrication de colorants, la conservation du bois et le tannage du cuir. Les effluents industriels contenant des composés de chrome sans traitement adéquat libérés directement ou indirectement dans les ressources en eau naturelle représentent les principales sources anthropiques de chrome qui provoque la contamination de l'environnement (**Cheung et Gu, 2007; Kavita et Keharia, 2012**).

Dans l'environnement, le chrome existe principalement dans deux états d'oxydation stables différents: le chrome trivalent Cr (III) et le chrome hexavalent Cr (VI). Ces formes sont différentes en termes de mobilité, solubilité, biodisponibilité et de toxicité. Le Cr (VI) est biologiquement plus toxique que le Cr (III) car il est dominant, stable, hautement soluble et rapidement perméable par le système de transport du sulfate suivi par l'interaction avec les protéines et les acides nucléiques (**Mishra et al., 2012**).

Des méthodes physico-chimiques et électrochimiques sont mise en œuvre pour traiter les rejets et les sites pollués par le chrome, elles visent à réduire le Cr (VI) en Cr (III) afin de diminuer ces impacts écotoxicologiques sur l'environnement. Ces méthodes sont connues pour leur cout élevé et la probabilité de créer une génération de polluants secondaires. Les stratégies de la bioremédiation sont été préconisées, y compris des études basées sur l'utilisation du potentiel métabolique des microorganismes, isolés à l'origine de l'environnement contaminé (**Aslam et al., 2016**).

L'élimination de ce métal à partir des milieux pollués ou la réduction de son potentiel toxique peuvent être réalisées par les microorganismes notamment les bactéries Gram positives. Dont *Bacillus megaterium* qui joue un rôle important dans le cycle biogéochimique des métaux est fortement impliqué dans le processus de la biorémediation (Stefanescu, 2015).

Dans ce contexte, notre travail est une contribution à la mise au point d'un bioprocédé pour traiter les effluents contaminés par le chrome, en utilisant la souche *B. megaterium* (A3-1) isolée des boues activées de la station d'épuration de la tannerie de Jijel. Cette étude permet d'évaluer la capacité de cette souche à éliminer le chrome (VI), avec l'influence de quelques paramètres qui devraient être pris en compte dans l'élimination des métaux lourds, ainsi que d'étudier le mécanisme impliqué afin de diminuer les impacts toxicologiques dans le milieu environnant.

Dans cette optique, notre travail pratique va s'articuler autour de ces trois principaux axes :

- La détermination de la concentration minimale inhibitrice du chrome, Plomb et du mercure.
- L'influence des trois paramètres (biomasse, pH et agitation) sur la croissance de la souche et sur l'élimination du chrome (VI) dans bouillon nutritif.

I. Historique :

L'histoire du chrome a commencé par la description d'un minerai rouge orange dans les montagnes de l'Oural, en 1761, par Johann Gottlob. Ce minerai était nommé la "plomb rouge de Sibérie", il a été identifié au départ comme composé de plomb, de sélénium et de fer. Il s'agissait du chromate de plomb ($PbCrO_4$) (**Jacobs et Testa, 2005**). En 1797, le chimiste français Nicolas Louis Vauquelin découvre le chrome dans le minerai de plomb rouge (crocoïte) (**Mishra et Bharagava, 2016**).

Ce métal fut nommé ainsi à cause des couleurs éclatantes qu'il donne à certains de ses composés. À partir de 1879, la chromite fut utilisée pour les fours métallurgiques à sole basique, servant à fabriquer les aciers. En 1898, Goldschmidt découvrit la réduction aluminothermique de cet oxyde qui seule permet de préparer de grandes quantités de chrome pure (**Baetjer et al., 1974; Jacobs et Testa, 2005**).

Au début du 19^{ème} siècle, le chrome fut utilisé dans les procédés de pigmentation aux bicarbonates. Aujourd'hui, le chrome trouve plus d'applications industrielles qui exploitent ses couleurs, sa solidité, sa dureté et sa résistance à la corrosion (**Mohanty et Patra, 2011; Polti et al., 2011**). Par conséquent, la prolifération des activités industrielles et l'utilisation intensive des déchets chromés provoquent la pollution par les métaux lourds, dont le chrome est le plus grave problème pour la biosphère (**Lyon et Vogel, 2013; Xu et al., 2015**).

II. Le chrome: propriétés, sources et toxicité

Le chrome est un métal lourd présent dans la nature sous forme liée en combinaison avec d'autres éléments. Il est considéré comme le sixième métal de transition le plus abondant sur Terre et le 21^e élément dans les roches de la croûte (Environ 122 ppm) (**Polti et al., 2011; Dhal et al., 2013; Focardi et al., 2013**).

Le chrome se présente dans l'environnement sous plusieurs formes en fonction de son degré d'oxydation, dont les états les plus stables sont; le chrome trivalent et le chrome hexavalent qui représentent des caractéristiques chimiques et physiques opposées (**Dhal et al., 2013; Fellenz et al., 2017**).

II.1. Propriétés physico-chimiques du chrome

II.1.1. Propriétés physiques

Le chrome a un numéro atomique de 24 et un numéro de masse de 51.9961, il appartient à la première série de métaux de transition. Les éléments vanadium, manganèse et molybdène entourent sa position dans le sous-groupe VIB du système périodique (**Avudainayagam et al., 2003; Pechova et Pavlata, 2007; Ahemad, 2014**).

D'autres propriétés physiques de cet élément sont regroupées dans le tableau I :

Tableau I: Les principales caractéristiques physiques du chrome (Mohanty et Patra, 2011).

La couleur	Gris acier-argenté
Numéro atomique	24
Point de fusion	1,900°C
Point d'ébullition	2,642°C
Densité	7,1g/cm³
Température de fusion	15,3 kJ / mol
température de vaporisation	347 kJ / mol
Chaleur d'atomisation	397 kJ / mol
Conductivité thermique	93,9 J / m s K
Conductivité électrique (1mohm / cm)	77.519
Affinité électronique	64,3 kJ / mol

II.1.2. Propriétés chimiques

Le chrome peut exister à différents états d'oxydation allant du Cr^{+0} au Cr^{+6} , dont les valences les plus importantes sont le Cr^{+3} et le Cr^{+6} qui sont présents selon l'état d'oxydoréduction du milieu (Mishra et Bharagava, 2016).

Les chromates et les dichromates sont les ions les plus importants du chrome, qui sont facilement réduits en chrome trivalent en solution acide et en présence de matière organique (Baetjer *et al.*, 1974).

II.1.2.1. Chrome trivalent

C'est l'état d'oxydation le plus stable et le moins toxique du chrome, en plus de ces propriétés, le chrome trivalent forme des complexes de coordination avec une variété de ligands donneurs d'électron qui peuvent être organiques ou inorganiques (Baetjer *et al.*, 1974).

Les complexes de chrome formés ont une tendance d'être adsorbé par des matières solides et des composés macromoléculaires, diminuant de ce fait la mobilité et la disponibilité du chrome trivalent dans les eaux. Les mesures d'équilibre ont identifié l'existence d'autres espèces en solution tel que : $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, $\text{Cr}(\text{OH})_3$, $\text{Cr}_2(\text{OH})_2^{4+}$, $\text{Cr}_3(\text{OH})_4^{5+}$ et $\text{Cr}_4(\text{OH})_6^{6+}$ en solution (Avudainayagam *et al.*, 2003; Pechova et Pavlata, 2007).

II.1.2.2. Le chrome hexavalent

Le Cr (VI) peut former plusieurs espèces, à savoir le CrO_4^{2-} , HCrO_4^- ou $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Cette spéciation est étroitement liée aux conditions physico-chimiques du milieu notamment le pH (Thatoi *et al.*, 2014). Le chrome hexavalent est fortement mobile, c'est un puissant oxydant, il présente une très grande solubilité qui lui confère cette très grande mobilité en milieu aqueux (Saha *et al.*, 2011; Mishra et Bharagava, 2016).

II.2. Les sources du chrome

Le chrome est un métal largement utilisé dans tous les domaines industriels, de sorte que sa présence dans les effluents provenant des différentes activités représente une pollution importante des sédiments, du sol, de l'eau et de l'air (Bhateria et Dhaka, 2017).

II.2.1. Les sources naturelles

Dans l'environnement, le chrome se trouve naturellement sous sa forme minérale (Mishra et Bharagava, 2016), il est largement distribué dans les roches, les schistes et les argiles, ainsi que dans l'eau potable et l'eau de mer, ceux-ci peuvent servir de source naturelle de la distribution de chrome dans l'environnement (Mohanty et Patra, 2011; Polti *et al.*, 2011).

II.2.2. Les sources anthropiques

Le chrome présent dans l'environnement est lié pour l'essentiel à des émissions d'origine industrielle. L'estimation mondiale totale de la consommation de chrome est de 12.5 millions tons, dont 85% sont consommés par des industries métallurgiques, 8% par les industries chimiques et 7% par les industries réfractaires (Al-Battashi *et al.*, 2016; Mishra et Bharagava, 2016).

II.2.2.1. Les industries métallurgiques

Les industries de la métallurgie sont la source principale de pollution toxique du chrome dans l'environnement, à cause de l'utilisation du chrome dans la fabrication des aciers inoxydables, des aciers alliés et des alliages non ferreux (Mohanty et Patra, 2011).

II.2.2.2. Les industries chimiques

Le chrome entre dans l'environnement par de nombreuses industries qui utilisent le chromate ou le dichromate comme matière première. Certaines d'entre elles sont: le tannage, l'industrie de textile, la peinture, les arts graphiques, les inhibiteurs de corrosion et la combustion des combustibles fossiles, telle que le charbon et le pétrole (Das et Mathew, 2011; Mohanty et Patra, 2011).

II.2.3. Autres sources

Il existe d'autres sources qui contribuent à la pollution par le chrome, parmi lesquelles, existent l'incinération des déchets, les zones de décharge et le transport (automobiles, véhicules à moteur diesel), en plus des engrais organiques et inorganiques, des pesticides, des fongicides ainsi que des boues d'épuration (**Mishra et Bharagava, 2016**).

II.3. Toxicité du chrome

La libération du chrome et de ses dérivés dans l'environnement contamine les sols, les eaux et les sédiments d'où l'apparition des problèmes sur l'environnement aussi bien que sur la santé humaine en raison de leur toxicité et mutagénicité (**Cheung et Gu, 2007; Thatoi et al., 2014**).

La forme hexavalente du chrome est la plus dangereuse et est considéré comme polluant majeur dans l'écosystème en raison de sa grande solubilité dans l'eau et de sa mobilité qui le rendent accessible à plusieurs organismes aquatiques et terrestres (**Arif et al., 2014; Carlos et al., 2016; Mishra et Bharagava, 2016**).

II.3.1. Chez l'Homme et les animaux

A l'état de trace, le chrome est un oligo-élément essentiel pour l'Homme et les animaux dans certaine limite, il est associé au métabolisme du glucose par son action sur l'insuline, il est bien connue que la forme trivalente est la forme nutritionnelle (**Pechova et Pavlata, 2007; Meli, 2009; Mohanty et Patra, 2011; Ahemad, 2014**).

Cependant, la forme hexavalente est hautement toxique et cancérigène capable de pénétrer dans le corps humain ou animal soit par inhalation, ingestion des aliments ou de l'eau, soit par adsorption cutanée principalement à travers les membranes cellulaires ce qui conduit au développement des stress oxydatifs (**Krishna et Philips 2005; Das et Mathew, 2011; Mohanty et Patra, 2011; Ahemad, 2014; Carlos et al., 2016**). Il peut s'accumuler dans le foie, les reins, les glandes thyroïdes et la moelle osseuse (**Mishra et Bharagava, 2016**).

Une fois à l'intérieur des cellules, le chrome hexavalent se lie au glutathion et grâce au soufre présent dans cette molécule, il est réduit en chrome (V) puis (IV) ou en (III) (**Focardi et al., 2013**). Les réactions de réduction naturelle du Cr (VI) sont schématisées dans la **figure 1**.

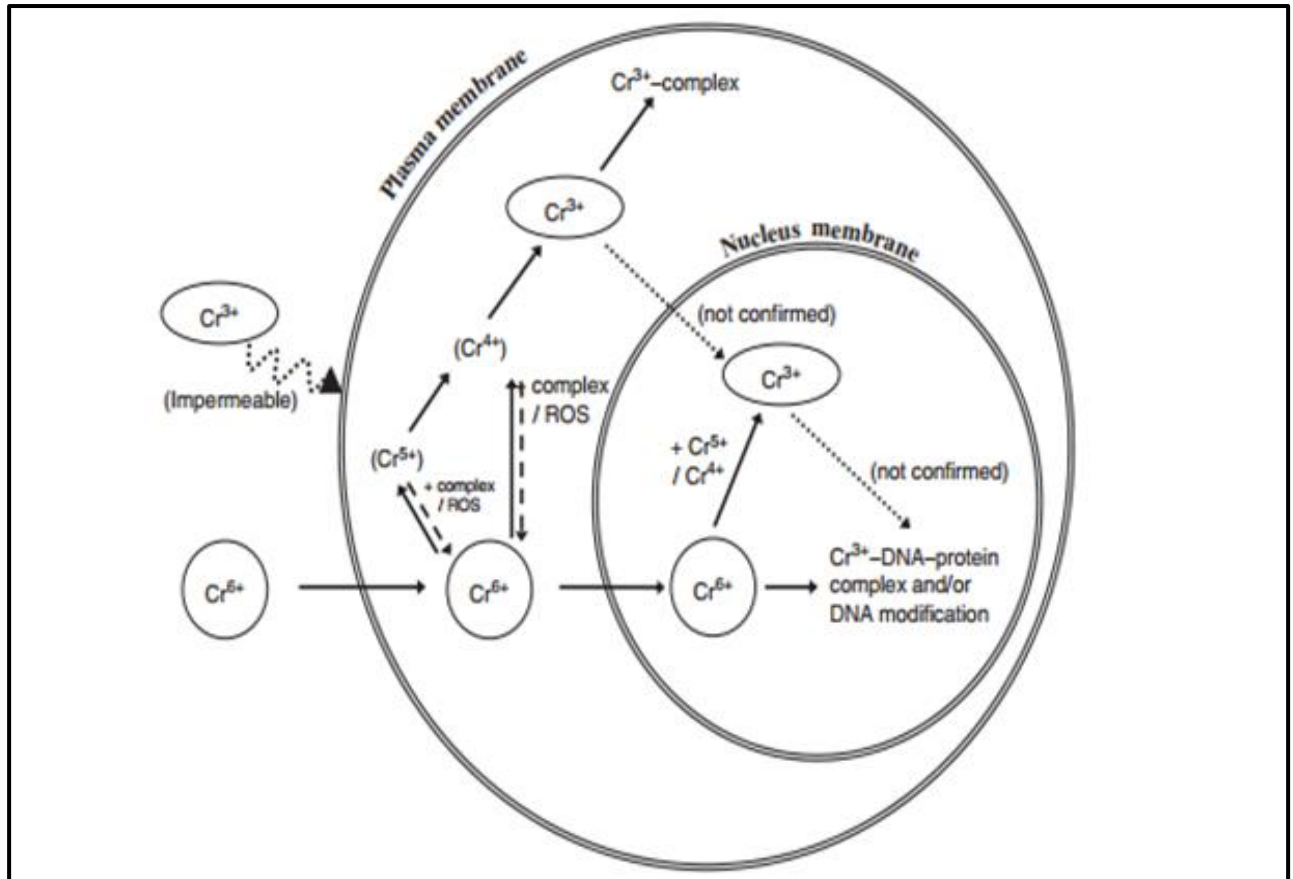


Figure 1: Diagramme de toxicité et mutagenicité du chrome hexavalent chez l'homme (Cheung et Gu, 2007).

Des études récentes ont suggéré que l'ingestion ou l'exposition professionnelle au Cr (VI) provoque des effets physiologiques sur la santé humaine (tableau II) (Das et Mathew, 2011; Mishra et Bharagava, 2016).

Tableau II : les majeurs effets physiologiques du chrome chez l'Homme (Mishra et Bharagava, 2016; Mohanty et Patra, 2011)

Effets cutanés	Les réactions allergiques, éruptions cutanées, irritants de la peau, sécheresse et gonflement.
Effets sur le système respiratoire	Une ulcération et perforation du tympan, une irritation de la Pharynx et larynx, bronchite asthmatique, irritation du nez et cancer du poumon.
Effets gastro-intestinaux	le chagrin Estomac et ulcères.
Effets rénaux	nécrose tubulaire aiguë et une insuffisance rénale chronique
Les effets cardiovasculaires	les changements dans L'altération du myocarde.
Les effets cancérogènes et effets mutagènes	les aberrations chromosomiques et les échanges de chromatides sœurs, damages d'ADN, mutations des gènes.

II.3.2. Chez les microorganismes

Dans l'environnement, les microorganismes sont exposés de façon continuée à divers métaux lourds qui peuvent être bénéfiques ou nuisibles à leur croissance, en fonction de la nature physico-chimique et de l'état d'oxydation des ions métalliques. Le chrome est considéré comme un nutriment essentiel pour les microorganismes vivants grâce à son activité notable pour les réactions de transport d'électrons dans les systèmes biologiques (Xu *et al.*, 2015; Mishra et Bharagava, 2016).

La présence de ce métal dans l'environnement peut être tolérée par différents groupes de microorganismes. La forme hexavalente du chrome exerce un effet toxique et mutagène sur les bactéries, les algues, et les champignons qui peut provoquer des allongements, agrandissements et enfin inhibition de la croissance cellulaire (Cervantes *et al.*, 2001; Avudainayagam *et al.*, 2003; Ahemad, 2014; Mishra et Bharagava, 2016). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les dommages oxydatifs aux protéines ont été bien établis comme un mécanisme central de la toxicité du Cr(VI). Le chrome intracellulaire pourrait produire des effets toxiques sur les microorganismes par différentes voies: inactivation de l'enzyme par la liaison au site actif de la phosphatase alcaline et peut avoir des effets délétères sur la structure et la fonction de la membrane (Mohanty et Patra, 2011; Mishra et Bharagava, 2016).

Une concentration de 10-12 mg par litre de Cr (VI) peut inhiber la croissance de la plupart des bactéries du sol, principalement les saprophytes et les bactéries nitrifiantes (Mohanty et Patra, 2011).

II.3.3. Chez les végétaux

Les études de la croissance des plantes vis-à-vis des faibles teneurs en chrome indiquent que ce composant ne semble pas essentiel pour sa survie mais une concentration supérieure à 100 µg /kg du poids sec est principalement toxique pour la plante (Avudainayagam *et al.*, 2003; Mishra et Bharagava, 2016).

Les effets toxiques du Cr (VI) sur les différentes espèces végétales comprennent la chlorose, la diminution de l'antioxydant, des stress oxydatifs et des altérations dans le processus de germination ainsi que dans la croissance des racines, des tiges et des feuilles qui peuvent affecter la production et le rendement en poids sec total (Das et Mathew, 2011; Mohanty et Patra, 2011; Arif *et al.*, 2014). Des effets néfastes sur les processus physiologiques des plantes ont également été notés. La complexation du chrome avec des composés organiques est impliquée dans la disponibilité du Cr aux plantes. La translocation et l'accumulation du chrome à l'intérieur des tissus dépendent

principalement de l'état d'oxydation, de l'alimentation et de la concentration (**Cervantes et al., 2001; Zayed et Terry, 2003; Mohanty et Patra, 2011**).

Peralta et al., (2001), ont été constaté que 40 ppm de Cr (VI) réduisaient d'environ 23% de la capacité des graines de luzerne (*Medicago sativa*) à germer et à croître dans le milieu contaminé.

III. Procèdes d'élimination du chrome

III.1. Procédés physico-chimiques

Traditionnellement, les méthodes de traitement physico-chimiques ont été développées pour réduire les concentrations élevées du chrome (VI) à des niveaux conformes aux normes statutaires (**Cheung et Gu, 2007**). Ces méthodes impliquent le principe fondamental de la précipitation chimique, traitement électrochimique, filtration membranaire, l'adsorption (charbon, charbon actif), l'échange d'ions, l'osmose inverse, l'électrodialyse, la nanofiltration et l'ultrafiltration ...etc (**Owlad et al., 2009; Das et Mathew, 2011; Singh et al., 2013**). Les principales méthodes utilisées pour le traitement sont décrites ci-dessus:

III.1.1. Osmose inverse

L'osmose inverse (l'inverse du processus classique d'osmose membranaire) est un processus axé sur la pression osmotique. L'eau peut passer à travers une membrane semi-perméable qui permet seulement le passage de l'eau, alors que les métaux lourds sont retenus (**Saha et al., 2013**).

Les membranes couramment employées sont asymétriques, peuvent consister en des solides secs, des gels, ou des matériaux immobilisés. L'acétate de cellulose et le permasep sont les principales membranes utilisées (**Brandhuber et Frey, 2005; Saha et al., 2013**).

III.1.2. Echange d'ions

L'échange d'ions est un processus essentiel par lequel les ions d'une solution donnée sont diffus à travers la surface d'un matériau solide insoluble (résine échangeuse d'ions) (**Saha et al., 2013; Kalidhasan et al., 2016**). Ce procédé est utilisé comme masse filtrante pour le traitement des eaux et des autres solutions aqueuses (**Chowdhury, 2009**).

Pour l'élimination du chrome, plusieurs résines spécifiques ont été utilisées dont: Dowex 2-X4, Ambersep 132, Amberlite IR 120, toutefois, le meilleur système pour le traitement des solutions contenant du chrome est issu de la combinaison de deux composés, la résine cationique « forte » et la résine anionique « faible ». Cette combinaison permet d'avoir un taux d'élimination très élevé (**Owlad et al., 2009**).

III.1.3. Précipitation chimique

La précipitation chimique implique un processus en deux étapes :

La première étape est la réduction du Cr (VI) dans des conditions acides habituellement pH 2-3, suivie de la précipitation de l'hydroxyde de Cr (III) à une solution dont le pH est situé entre 8-10.

Dans ce procédé, plusieurs agents réducteurs sont couramment utilisés; le dioxyde de soufre, le sulfite de sodium, le bisulfite de sodium et le sulfate ferreux (Chowdhury, 2009; Saha *et al.*, 2011). En plus du fer (II) étant un réducteur, le fer (III) qui est formé est un précipitant efficace pour le Cr (III). Cet effet du fer (III) semble être dû à la formation d'hydroxyde ferrique insoluble qui co-précipite avec l'hydroxyde de Cr (III) (Chowdhury, 2009; Xu *et al.*, 2015).

III.1.4. L'électrocinétique

L'électrocinétique est une technique relativement nouvelle pour la remédiation *in situ* des sites pollués (Das et Mathew, 2011). Le concept des phénomènes électrocinétiques est fondé sur le mouvement des espèces sous un champ électrique. Les principaux mécanismes impliqués dans le processus sont: l'électro-migration, l'électro-osmose et l'électrophorèse (Yeung, 2006; Das et Mathew, 2011).

III.1.5. L'adsorption

L'adsorption est une méthode très simple, efficace et plus utile pour le traitement des eaux usées en raison de leur efficacité dans l'élimination des polluants persistants qui se fixent sur la surface d'un solide (adsorbant) (Kyzas *et al.*, 2013; Arab *et al.*, 2014). Une variété de matériaux naturels et synthétiques est utilisée comme adsorbant pour le Cr (VI) y compris : le charbon actif, des matériaux biologiques, des zéolites et du chitosane...etc.

En particuliers, le charbon actif est considéré comme l'adsorbant de choix dans l'adsorption du chrome en particulier le chrome hexavalent (Owlad *et al.*, 2009).

Généralement, ces méthodes présentent certains inconvénients sont résumés dans le **tableau III**:

Le tableau III : Inconvénients de quelques méthodes conventionnelles.

Méthodes de traitement	Les inconvénients	Référence
Osmose inverse	Equipement coûteuse, systèmes de surveillance coûteux, exigences énergétiques élevées.	(Saha <i>et al.</i> , 2013)
Echange d'ions	Elimination incomplète du chrome des solutions à haute teneur en sel, n'est pas sélective et très sensible au pH de la solution.	(Bhateria et Dhaka, 2017)
Adsorption	Faible sélectivité, production des déchets	(Bhateria et Dhaka, 2017)

III.2. Les procédés biologiques

II.2.1. La biosorption

La biosorption est un processus indépendant du métabolisme passif, il est rapide et réversible et il met en jeu la biomasse microbienne vivante inactive ou morte pour séquestrer les métaux lourds toxiques. Il est particulièrement utile pour l'élimination des contaminants des effluents industriels (**Kratochvil et Volesky, 1998; Srinath et al., 2002; Hlihor et al., 2014; Vendruscolo et al., 2017**). La biosorption est essentiellement une réaction de complexation physico-chimique non dirigée entre les espèces de métal dissous et les composants cellulaires chargés, qui impliquent la sorption des métaux (**Kamaludeen et al., 2003**).

Une grande variété de biosorbants sont utilisés comme séquestrants pour les métaux tels que les matières lignocellulosiques actives ou les microorganismes inactifs (**Hlihor et al., 2014**).

Plusieurs études ont rapporté que l'utilisation des microorganismes devient la méthode la plus populaire pour l'élimination du Cr (VI) sans générer des déchets secondaires dangereux, les bactéries sont les meilleurs candidats qui peuvent être facilement cultivées et manipulées, telles que *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Bacillus* (**Das et al., 2008; Sukumar et al., 2014**).

Les levures et les champignons ainsi que les algues peuvent séquestrer efficacement les métaux en solution, en raison de leur capacité de liaison aux métaux, grâce à des groupes fonctionnels présents dans leur parois cellulaires (**Kamaludeen et al., 2003; Vendruscolo et al., 2017**).

Srinath et al., (2002), ont démontré que *B. megaterium* est une bactérie capable d'éliminer le Cr (VI) par biosorption sur des cellules mortes à pH 2,5.

II.2.2. Biofilms dans les bioréacteurs

Les biofilms bactériens sont aussi recommandés comme moyens efficaces pour la remédiation des contaminants dans l'environnement, car ils présentent une tolérance à la dessiccation, à des hauts niveaux de polluants et d'autres facteurs de stress (**Kamaludeen et al., 2003**).

Pazos et al., (2010), mis le point sur un processus qui implique la bioréduction du Cr (VI) au Cr (III) par la bactérie *Arthrobacter viscosus* dans un bioréacteur, avec l'évaluation des différents paramètres, tels que la concentration de la biomasse, le pH et le prétraitement de la zéolite. Les résultats ont confirmé que le bioréacteur contenant un biofilm sur la zéolite 13X peut être utilisé dans la réduction du Cr, dont la réduction efficace s'effectue dans une concentration de la biomasse d'environ 5g/L et avec un pH maintenu à un niveau acide. **Smith et Gadd, (2000)**, ont démontré qu'un biofilm d'une culture mixte de bactéries sulphatoréductrices qui utilisent le lactate comme source de carbone était capable de réduire environ 88% du Cr (VI) total sur une période de 48h.

II.2.3. Cellules immobilisées

Les cellules immobilisées sur un gel de polyacrylamide peuvent être utilisées pour la désintoxication efficace et l'élimination des métaux en solution à partir d'un effluent dans un réacteur (**Kamaludeen et al., 2003**).

A titre d'exemple, *Bacillus sphaericus* ADN 303, une bactérie résistante et réductrice du chrome a été évaluée pour sa capacité à réduire le Cr (VI) par cellules immobilisées dans une culture discontinue. La réduction du chromate par *B. sphaericus* ADN303 immobilisé dans des billes d'alginate de PVA peut réduire 87,5% de Cr (VI) à 20 M en 24h. L'efficacité de la réduction a été améliorée en présence de glucose et de glycérol en tant que donneurs d'électrons pour compléter la réduction (**Pal et al., 2013**).

Intrasporagium Q5-1 qui utilise une variété de sources de carbone dont l'acétate pour stimuler la réduction du chrome hexavalent, offre un excellent potentiel pour l'élimination du chrome (VI) présent dans les eaux usées, dans des conditions aérobies, à 37°C et à pH du 8.

De plus, les cellules de *Desulfovibrio vulgaris* immobilisées dans la gélose ont la capacité de réduire 0,5 mM de Cr (VI) à 0,1 mM en 22h, *Microbacterium* sp. NCIMB 13776 immobilisé dans la gélose peut réduire 0,5 mM de Cr (VI) à 0,26 mM en 65h, tandis que *Streptomyces griseus* immobilisé dans un gel de PVA-alginate S23 peut éliminer jusqu'à 0,48 mM de Cr (VI) dans 24h (**Yang et al., 2009**).

II.2.4. Bioréacteur utilisant des microorganismes vivants

Les chercheurs ont développé un procédé efficace de la réduction du chromate par l'utilisation d'une souche de *Pseudomonas mendicina* MCM B-180 pour le traitement des eaux usées contaminées par le chrome. La souche bactérienne utilisée est capable de résister jusqu'à 1600 mg/l du chrome et réduit totalement environ 2 mM du chromate.

Dans un bioréacteur en mode continu et dans des conditions d'anaérobiose, 20 ml de cette bactérie peuvent éliminer environ 25 à 100 mg/L des chromate après 8h en utilisant la mélasse comme source de carbone (**Kamaludeen et al., 2003**).

IV. Résistance microbienne au chrome et mécanismes de réduction

IV.1. Résistance microbienne au chrome

La plupart des espèces microbiennes sont sensibles au Cr (VI), mais certaines d'autres sont dotées des systèmes efficaces capables de résister et tolérer même des niveaux élevés de chrome. Chez les bactéries, les mécanismes de résistance au chrome sont variés et peuvent être portés par des gènes plasmidiques ou par des gènes chromosomiques. Habituellement, les gènes plasmidiques codent pour les transporteurs membranaires, qui sont directement responsables de l'efflux des ions

chromates cytoplasmiques (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2011; Viti *et al.*, 2014; Joutey *et al.*, 2015; Al-Battashi *et al.*, 2016).

D'autre part, les systèmes de résistance sur les chromosomes bactériens sont généralement liés à des stratégies comme la réduction spécifique ou non spécifique du Cr (VI), les activités de la désintoxication des radicaux libres, la réparation des dommages de l'ADN et les processus associés à l'homéostasie du soufre ou du fer (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008; Ahemad, 2014; Viti *et al.*, 2014). Les principaux mécanismes de résistance sont résumés dans la figure 2.

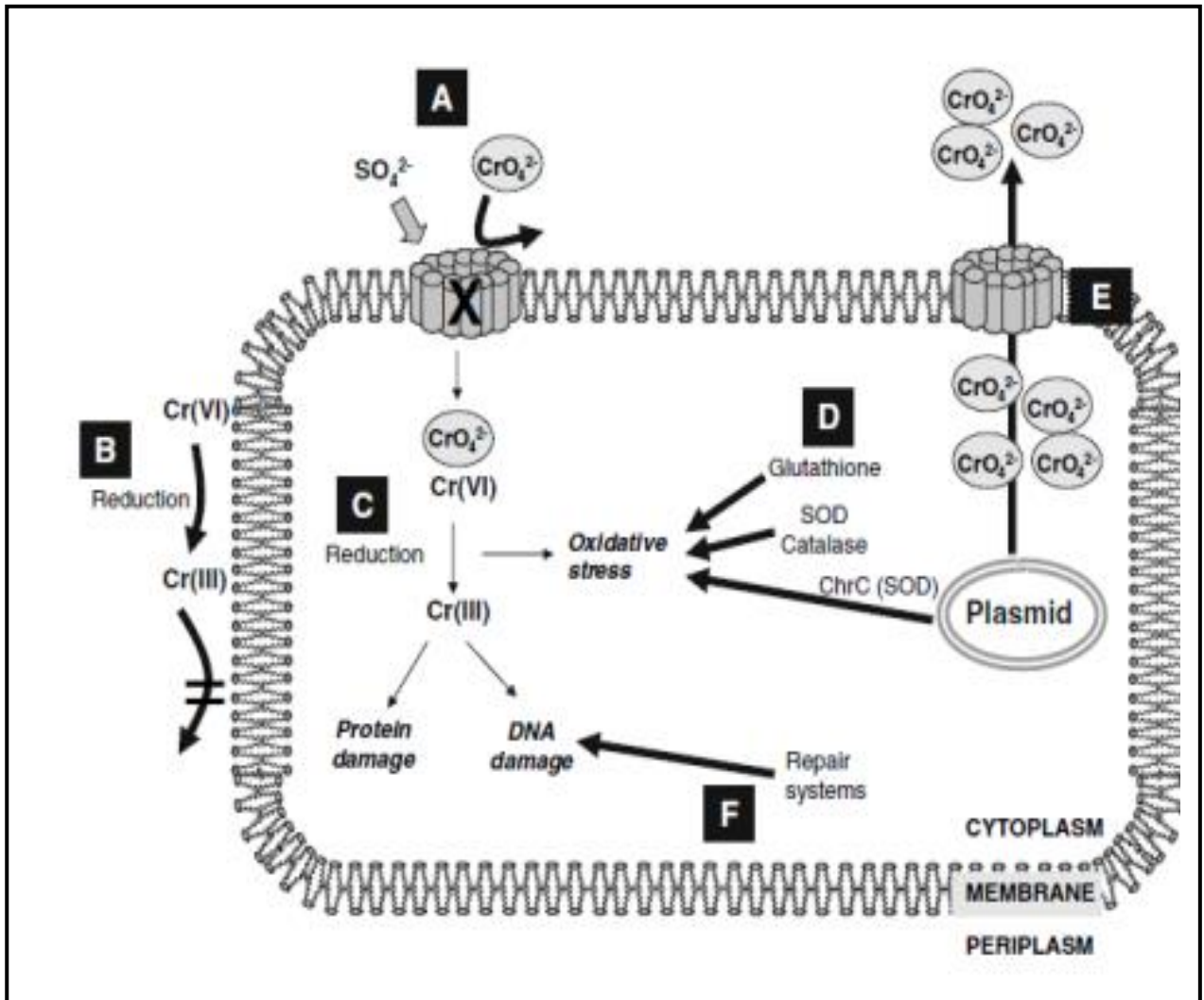


Figure 02 : Mécanismes de résistance du chromate dans les cellules bactériennes (Thatoi *et al.*, 2014).

(A). Mutation dans les transporteurs d'absorption de sulfate codés par des chromosomes. (B). Réduction extracellulaire du Cr (VI) à Cr (III). (C). Réduction intracellulaire du Cr (VI) en Cr (III) par chromate réductases. (D). Fonction du système de réparation SOS pour réduire le stress oxydatif. (E). Système d'efflux: la protéine ChrA. (F). Action de l'enzyme de balayage ROS dans la réduction du stress oxydatif.

Les mécanismes de résistance microbienne au Cr (VI) les mieux connus sont les suivants :

IV.1.1. Mutation du système de transport du sulfate

L'un des systèmes de protection contre les effets toxiques du Cr est probablement associée à réduction du Cr (VI) par la voie d'absorption du sulfate et à l'homéostasie du soufre ou du fer (**Ramírez-Díaz et al., 2008**).

Les ions chromates (CrO_4^{2-}), en raison de leur similitude de structure chimique avec les ions sulfates tétraédriques (SO_4^{2-}), peuvent facilement passer à travers la membrane cellulaire via la voie de transport du (SO_4^{2-}) à l'aide d'un transporteur anionique non spécifique (le sulfate perméase). De manière générale, le transport du chromate chez les bactéries diminue lorsque la voie d'absorption du sulfate est modifiée par une mutation chromosomique. Dans le cas d'un système de transport fonctionnel, les chromates peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule ce qui entraîne des perturbations métaboliques et par la suite des altérations directes sur l'ADN.

Le microorganisme est donc sensible aux chromates. Par contre, dans le cas d'un système de transport non fonctionnel, les micro-organismes présents dans l'environnement contaminé par le métal subissent une mutation rapide pour développer une résistance au chromate ce qui conduit à réduction du Cr (VI) par voie de transport du sulfate. Dans ce cas, les ions chromates et sulfates ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur de la cellule (**Morais et al., 2011; Thatoi et al., 2014; Viti et al., 2014**).

IV.1.2. Système d'efflux : la protéine ChrA

L'efflux des ions chromate semble un mécanisme efficace de la résistance au chrome. Il est lié à la présence des gènes plasmidiques spécifiques qui empêchent l'accumulation d'ions toxiques à l'intérieur des cellules bactériennes (**Thatoi et al., 2014; Pradhan et al., 2016**).

Le système le mieux compris de la tolérance est celui qui confère la protéine ChrA à *P. aeruginosa* et qui est responsable du phénotype résistant (**Alvarez et al., 1999; Pradhan et al., 2016**).

ChrA est une protéine membranaire hydrophobe appartenant à la superfamille CHR des transporteurs d'ions chromate, elle est codée par les plasmides pUM505 chez *P. aeruginosa*, pARI180 chez *Pseudomonase. mendocina* et pMOL28 chez *Cupriavidus metallidurans* qui sont révélés être impliqués dans la résistance au chromate par le mécanisme d'efflux de chromate. La protéine ChrA fonctionne comme une pompe chimiosmotique qui exporte le chromate du cytoplasme ou du périplasme directement à l'extérieur de la cellule en utilisant l'énergie provenant du gradient de protons de la membrane interne (**Alvarez et al., 1999; Ramírez-Díaz et al., 2008; Ahemad, 2014; Thatoi et al., 2014; Joutey et al., 2015**).

IV.1.3. La réduction extracellulaire du Cr (VI)

Un autre mécanisme important de la résistance au chrome est la réduction extracellulaire du Cr (VI) en Cr (III) suivie par sa liaison avec des groupes fonctionnels sur la surface des cellules bactériennes (Thatoi *et al.*, 2014; Joutey *et al.*, 2015). Cette liaison est due à la présence du peptidoglycane de la paroi cellulaire qui permet son retrait facile de l'environnement contaminé.

Des études ont démontré que certaines espèces de bactéries possèdent des propriétés d'adsorption qui facilitent l'élimination des espèces métalliques à partir des solutions aquatiques. Ces propriétés dépendent en grande partie de la répartition des groupes, carboxyle, amine, hydroxyle, phosphate et sulfhydryle sur la surface de la paroi cellulaire des bactéries, qui empêchent l'entrée de métal à l'intérieure des cellules (Thatoi *et al.*, 2014).

IV.2. La réduction microbienne du Cr (VI)

La réduction biologique est une technique innovante représentée par la bioremédiation, qui utilise le potentiel métabolique des microorganismes pour éliminer les métaux toxiques, afin de décontaminer les zones polluées (Krishna Philip 2005; Focardi *et al.*, 2013). La réduction du chromate par une grande variété de bactéries Gram+ et Gram- résistantes au Cr, ainsi que différentes espèces de levures et de champignons ont été rapportées et semblent être les candidats les plus prometteurs pour la bioremédiation (Pal *et al.*, 2013).

IV.2.1. La réduction par les bactéries

Les bactéries réduisent le Cr (VI) par des éléments chimiques (indirects) ou enzymatiques (directes). La réduction chimique du Cr (VI) s'effectue par l'action des métabolites bactériens tels que le H₂S (Kamaludeen *et al.*, 2003). Par contre, la réduction enzymatique du Cr (VI) est effectuée par des réductases membranaires ou solubles qui existent chez les bactéries aérobies, facultatives et anaérobies (Ramirez-Diaz *et al.*, 2008).

IV.2.1.1. Mécanismes directs

- **Aérobic:**

La réduction du Cr (VI) dans des conditions aérobies est couramment associée à des chromates réductases solubles qui utilisent le NADH ou le NADPH comme cofacteurs. Actuellement, la chromate réductase la mieux étudiée est la ChrR de *P. putida*, qui est une enzyme de flavine soluble capable de catalyser la réduction du Cr (VI) en Cr (III) (Viti *et al.*, 2014).

En présence d'oxygène, l'enzyme ChrR responsable de la réduction de Cr (VI) au Cr (III) nécessite le couple (NADH/ NADPH) qui sert comme donneur d'électrons, deux étapes de la

réaction ont été suggérées d'être impliquées dans la réaction de réduction (Cheung et Gu, 2007; Viti *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015).

L'enzyme ChrR catalyse une combinaison de transferts d'un électron au Cr (VI) avec la formation de l'espèce instable Cr (V) avant une nouvelle réduction en Cr (III). Bien qu'une proportion de l'intermédiaire Cr (V) subit un cycle redox à un électron pour régénérer le Cr (VI) en transférant l'électron à l'oxygène, ce processus produit des ROS, sa réduction en Cr (III) est effectuée par le transfert de deux électrons, ce qui minimise la production des radicaux nocifs (Thatoi *et al.*, 2014; Joutey *et al.*, 2015).

L'enzyme YieF (ChrR d'*E. coli*) implique quatre électrons pour la réduction du chromate, dont elle transfère simultanément trois électrons au chromate pour produire le Cr (III) et un électron à l'oxygène moléculaire, générant des ROS (Ramirez-Diaz *et al.*, 2008; Bhateria et Dhaka, 2017). Le mécanisme de réduction enzymatique du Cr (VI) est illustré dans la Figure 3.

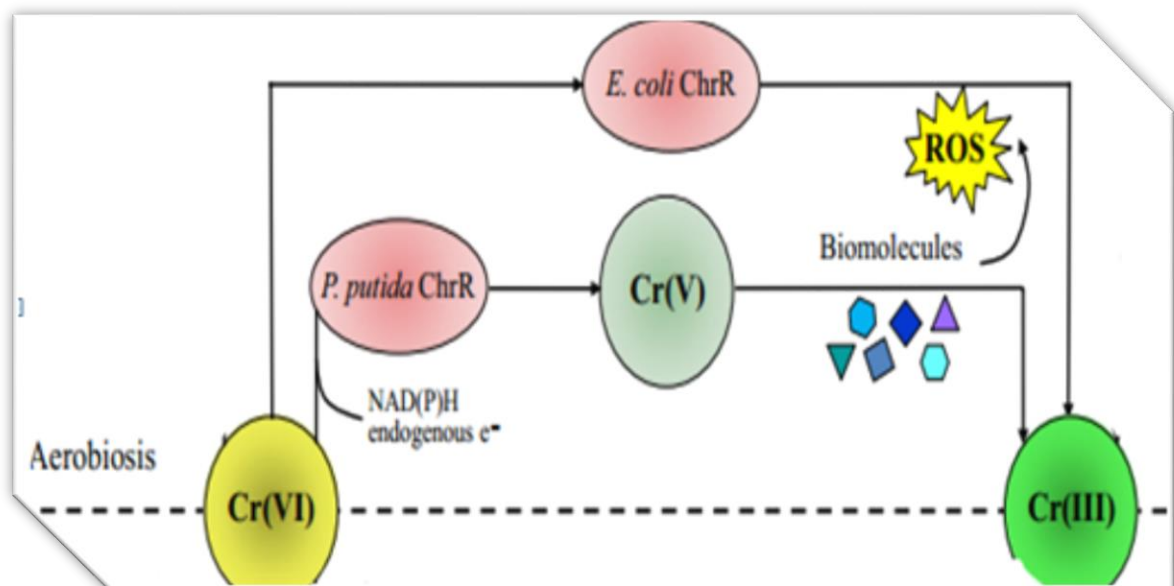


Figure 3: Mécanisme enzymatique de réduction du chrome hexavalent en aérobiose (Viti *et al.*, 2014).

▪ Anaérobic:

La réduction anaérobie par les bactéries est habituellement associée à des réductases liées à la membrane comme la "flavine réductase", les "cytochromes" et les "hydrogénases" qui peuvent faire partie du système de transport d'électrons et utiliser le chromate comme accepteur final d'électrons (Ahemad, 2014; Thatoi *et al.*, 2014). En absence d'oxygène, le Cr (VI) agit comme un accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire pour un large éventail de donneurs d'électrons, y compris les hydrates de carbone, les protéines, les graisses, l'hydrogène, et le NAD(P) H (Cheung

et Gu, 2007; Ramirez-Diaz *et al.*, 2008). *Pseudomonas dechromaticans* isolé à partir des boues d'épuration a été rapporté pour réduire le Cr (VI) dans des conditions anaérobies en l'utilisant comme accepteur final d'électrons.

Ainsi que *Enterobacter cloacae*, isolé à partir des eaux usées industrielles, qui utilisait le chromate /dichromate comme accepteur final d'électrons pendant la réduction du Cr (VI) dans l'espace périplasmique par une hydrogénase liée à la membrane (Thatoi *et al.*, 2014).

IV.2.1.2. Mécanisme indirect

La réduction bactérienne du Cr (VI) peut se produire directement par l'activité enzymatique comme mentionnée plus haut, ou indirectement par des voies non enzymatiques en produisant des composés tels que le glutathion, la cystéine, l'acide ascorbique, le peroxyde d'hydrogène, ...etc., qui peuvent réduire le Cr (VI) (Thatoi *et al.*, 2014). Les bactéries sulfite réductrices et les bactéries réductrices de fer (SRB et IRB), respectivement sont des anaérobies, qui ont un intérêt biotechnologique et environnemental, notamment dans la réduction du chrome. Les SRB produisent du H₂S, qui sert comme réducteur du Cr (VI) en trois étapes :

(a) la réduction des sulfates, (b) la réduction du chromate par les sulfures et (c) la précipitation du Cr (VI) par les sulfures (Thatoi *et al.*, 2014; Joutey *et al.*, 2015). La réduction du Cr (VI) par Fe (II) se produit lorsqu'IRB réduit le Fe (III) en Fe (II), ce qui réduit le Cr (VI) en Cr (III) (Joutey *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015).

IV.2.2. La réduction par les champignons et les levures

Les levures et les champignons filamenteux tels que *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. et *Trichoderma inhamatum* offrent également une alternative importante pour la bioremédiation des eaux et des sols pollués par le Cr (Cervantes *et al.*, 2001; Viti *et al.*, 2014).

De nombreux champignons contiennent de la chitine, l'homopolymère de la N-acétylglucosamine et du chitosan, un hétéropolymère de N-acétylglucosamine et de glucosamine, en tant que partie intégrante de la structure de leur paroi cellulaire. Les groupes aminodésacétylés de la glucosamine peuvent agir comme sites de liaison pour l'adsorption des métaux toxiques et notamment le chrome (Cervantès *et al.*, 2001). Récemment, il a été suggéré que la désintoxication du Cr (VI) se produit par des substances réductrices extracellulaires qui sont sécrétées par des cellules de levure comme le sulfate et la riboflavine. En effet, de nombreuses souches de levure sont connues pour biotransformer le Cr (VI) en Cr (III), les exemples incluent *S. cerevisiae*, *Rhodotorula pilimanae*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha* et *Pichia guilliermondii* (Viti *et al.*, 2014).

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période Avril- Juin de l'année 2017.

Ces expérimentations ont pour but d'évaluer l'effet de quelques paramètres (pH, biomasse et agitation) sur la cinétique de la croissance bactérienne et sur l'élimination du chrome hexavalent par *Bacillus megaterium* (A3-1) préalablement isolé à partir de la station d'épuration de la tannerie de Jijel ainsi que d'étudier le processus d'élimination du chrome (VI) par cette souche.

I. MATERIEL

I.1. La souche bactérienne

La souche bactérienne *B. megaterium* (A3-1), utilisée dans ce travail est un bacille, Gram positif et aérobie stricts, qui a été isolée et identifiée à partir de la boue activée de la station d'épuration de la tannerie de Jijel. Cet isolat a été sélectionné pour sa capacité à croître en présence du chrome (VI). La pureté de la souche bactérienne (A3-1) a été vérifiée en la repiquant sur gélose nutritive pour l'obtention des colonies pures isolées.

I.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont :

- Bouillon nutritif déshydraté (BN) (fournisseur) (**Annexe 2**)
- Gélose nutritive (GN) (fournisseur).

I.3. Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques nécessaires pour réaliser ce travail sont les suivants :

- Dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$)
- Chlorure de mercure $HgCl_2$
- Nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$
- Acide sulfurique (H_2SO_4)
- 1-5 diphénylcarbazine ($C(NH)_4O(C_6H_5)_2$)
- Alcool éthylique à 95°
- Acide nitrique à 1%

I.4. Appareillage

Tout au long de ce travail, nous avons utilisé l'appareillage qui suit :

- Bec Bunsen
- Autoclave (Slli AVX electronic)
- Four pasteur (Memmert)
- Etuve 37°C (Memmert)

- Réfrigérateur (ENIEM)
- Spectrophotomètre UV visible (Jenway 7315)
- Bain marie (Gerhardt Bonn)
- Incubateur agitateur (Infors HT Ecotron)
- Centrifugeuse (Hettich EBA 20)
- pH-mètre (Hanna)
- Balance électronique (Kern EMB600-2)
- Balance analytique
- Agitateur magnétique chauffant (Heidolph MR 3002)
- Vortex (VWR VV3)

II. METHODES

II.1. Revivification de la souche

La revivification de la souche est une étape essentielle avant chaque expérience. Pour cela, nous avons fait des prélèvements de quelques colonies sur gélose nutritive de la souche (A3-1) avec l'anse de platine et nous l'avonsensemencé dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif, ensuite les tubes sont incubés à 37°C sous agitation pendant 18h.

II.2. Préparation de la solution mère des métaux lourds

Une solution mère de Cr (VI), Pb (II) et Hg (II) a été préparée par dissolution d'une quantité déterminée de (2,83 g, 1,3 g et 1,35 g) (**Annexe 3**) de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$ et chlorure de mercure $HgCl_2$, respectivement, dans 1L d'eau déionisée de façon à obtenir une concentration égale à 1000 mg/L. Les autres concentrations sont obtenues par des dilutions successives (**Guo et al., 2010; Mahjoub et al., 2015**).

II.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La CMI est définie comme la plus faible concentration en métaux lourds capable d'empêcher le développement visible de la bactérie (**Carlos et al., 2016**). L'application de cette technique permet de déterminer le seuil de résistance de la souche bactérienne *B. megaterium* aux trois métaux lourds suivants : le plomb (Pb), le chrome (Cr) et le mercure (Hg).

Dans ce travail, pour mesurer la concentration minimale inhibitrice de la souche bactérienne (A3-1). Nous avons utilisé la méthode de dilution sur tubes qui consiste à faire une série de dilutions croissantes de la solution mère des métaux (plomb, chrome et mercure) (de 10 à 100mg/L) ayant une concentration de 1000 mg/L selon le protocole de **Hassen et al., (1998)**:

Premièrement, une série de tubes à essai contenant un volume final de 10 ml de bouillon nutritif a été inoculée par 10% de l'inoculum de *B. megaterium* préalablement activée dans chaque tube qui contient le gradient croissant en Cr, Pb et Hg ainsi qu'un tube témoin ne contenant que le bouillon nutritif et l'inoculum.

Parallèlement, une deuxième série de tubes a été préparée qui représente un blanc pour chaque concentration. Par la suite, les tubes sont incubés sous agitation à 37°C pendant 24h. La croissance bactérienne est suivie par la mesure de la DO à 600 nm à t₀ et à t_{24h}.

Après l'incubation et la lecture, la plus faible concentration de métal qui inhibe la croissance bactérienne a été prise comme CMI.

II.4. Effet de quelques paramètres sur la croissance et la réduction du chrome

II.4.1. Effet du pourcentage de l'inoculum

Des erlenmeyers de 250 ml, contenant 50 ml de bouillon nutritif avec une concentration de 30 mg/l du chrome hexavalent ont été inoculés par différents pourcentage d'inocula (5%, 10%, 12,5%) de la souche préalablement activée et incubés à 37°C sous agitation.

Pour chaque erlenmeyer, des échantillons de 5 ml sont prélevés dans des conditions d'asepsies pendant différentes temps d'incubation t₀, t_{24h}, t_{48h} et t_{72h}, pour suivre la cinétique de la croissance de *B. megaterium* par la mesure de l'absorbance à 600 nm.

Parallèlement, ces échantillons ont été centrifugés pendant 15 min à 6000 rpm, le chrome hexavalent est dosé dans les surnageants par la méthode colorimétrique au diphénylcarbazide (DPC) (Carlos *et al.*, 2016).

II.4.2. Effet du pH

Afin d'étudier le profil de croissance et le taux de réduction du Cr (VI) dans des conditions légèrement acides et alcalines, des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu BN ont été préparés à différents pH (5, 6, 7 et 8). Le pH du milieu est ajusté avec du NaOH ou du HCl.

Le Cr (VI) est ajouté au milieu sous forme d'une solution de dichromate de potassium à une concentration finale de 30 mg/L, par la suite le milieu estensemencé avec 5% de la souche bactérienne (A3-1). Les erlenmeyers sont incubés à 37°C sous agitation, la croissance cellulaire pour chaque erlenmeyer est estimée par la mesure de l'absorbance à 600 nm pendant différent temps t₀, t_{24h}, t_{48h} et t_{72h}. Le dosage du Cr (VI) est réalisé par la méthode colorimétrique au DPC.

II.4.3. Effet de l'agitation

Dans le but d'explorer l'influence de l'agitation sur la réduction du chrome, 50 ml de bouillon nutritif stérile ajusté au pH 7 contenant une concentration de 30 mg/L du chrome hexavalent sont introduits séparément dans deux erlenmeyers de 250 ml qui sont ensuiteensemencés par 5% de l'inoculum bactérien préalablement activé.

Les erlenmeyers, sont ensuite incubés l'un sous agitation et l'autre sans agitation à 37°C, des échantillons de 5 ml ont été retirés à des intervalles de temps régulières (t₀, t_{24h}, t_{48h}, t_{72h}) pour surveiller la croissance cellulaire par la mesure de la densité optique pour chaque erlenmeyer à 600nm. La concentration du Cr (VI) est évaluée par la méthode colorimétrique.

- Pour chaque paramètre deux tests témoins sont préparés : Un 1^{er} dépourvu de la culture bactérienne, pour évaluer l'impact des facteurs abiotiques sur le devenir du chrome et un 2^{ème} dépourvu du Cr pour évaluer la croissance cellulaire de la souche bactérienne (A3-1).

II.5. La bioaccumulation par la souche bactérienne

Dans deux erlenmeyers de 250 ml, on a préparé un volume final de 50 ml de bouillon nutritif qui a étéensemencé par 5% de la culture bactérienne préalablement activée, ceci est en présence d'une concentration de 30 mg/L en Cr (VI) dans l'un des erlenmeyers, alors que l'autre est exempt de chrome. Les erlenmeyers sont ensuite incubés sous agitation à 37°C pendant 72h.

A partir de chaque erlenmeyer, deux prélèvements de 5 ml ont été réalisés plusieurs fois à t_{24h}, t_{48h} et t_{72h}. Les échantillons ont été récoltés après centrifugation à 6000 rpm pendant 15 min. Les culots ont été lavés deux fois avec l'eau distillée.

Parallèlement, le culot du tube qui survivra pour la lyse cellulaire est mis en suspension dans l'acide nitrique 1% avec un temps d'incubation de 24h à 4°C. Par la suite, une centrifugation supplémentaire a été réalisée à 6000 rpm pendant 10 minutes et le surnageant obtenu servira pour déterminer les ions du chrome bioaccumulés à l'intérieur de la cellule.

Le culot de l'autre tube qui servira pour la mesure du poids sec de la biomasse été séché dans une étuve à environ 80°C, puis pesé à l'aide d'une balance analytique.

II.6. Méthode colorimétrique de dosage du chrome (VI)

La mesure de la concentration du Cr (VI) résiduel dans chaque étape a été effectuée selon la méthode colorimétrique standard (GREENBERG *et al.*, 1985). Le Cr (VI) de l'échantillon à analyser est mélangé avec un agent complexant, le 1,5-diphenylcarbazide en milieu acide. Ainsi, un complexe rose violacé se forme après 10 à 15 minutes, et son intensité est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm (Mahjoub *et al.*, 2015; Carlos *et al.*, 2016).

II.6.1. Préparation de la solution acide de diphenylcarbazine (DPC)

On dissout 0,20 g de 1,5-diphénylcarbazine chimiquement pure dans un volume de 100 ml d'alcool éthylique à 95°. Ensuite, on rajoute 400 ml de la solution d'acide sulfurique de concentration 176 g/L (100 ml d'acide sulfurique dans 1 L d'eau distillée) (Zhao *et al.*, 2011). Cette solution se conserve au réfrigérateur dans un flacon teinté et reste stable pendant un mois environ.

II.6.2. Etablissement de la courbe d'étalonnage du chrome (VI)

Une solution fille étalon de chrome (VI) à 5 mg/L est obtenue par dilution de 1/200 de la solution mère de chrome dans l'eau distillée. Puis, à partir de cette solution fille, nous avons préparé des dilutions avec un volume final de 50 ml couvrant la gamme de concentrations suivantes : 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 mg/L (Marzouk, 2012).

II.6.3. Mode opératoire

Dans une série de fioles jaugées bouchées émeri, on introduit 50 ml de l'échantillon à doser et 3 ml de la solution acide de diphenylcarbazine. Après homogénéisation, on laisse les fioles au repos pendant 10-15 minutes pour permettre un développement complet de la coloration rouge-violette. Le blanc a été préparé dans les mêmes conditions avec 50 ml de bouillon nutritif. Ensuite, on effectue les lectures au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm (Mahjoub *et al.*, 2015).

A partir des valeurs de DO mesurées à 540 nm pour les solutions étalons, nous avons tracé la courbe d'étalonnage du chrome (Annexe 4) et les concentrations du Cr (VI) des échantillons sont tirées et calculées à partir de cette courbe étalon selon la relation:

$$C_f = C_0 \times F$$

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

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

F : facteur de dilution.

II.6.4. Calcul du taux de réduction du chrome(VI)

Le taux de réduction du chrome est calculé en utilisant la formule suivante (Ghosh *et al.*, 2017):

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

C_0 : concentration initiale du Cr (VI)

C_t : concentration du Cr (VI) en temps t

t : temps d'incubation

I. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La tolérance des cellules bactériennes de la souche *Bacillus megaterium* à différents métaux lourds (Chrome, Plomb et Mercure) a été estimée après détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) car elle permet de déduire la concentration du métal la plus élevée dans laquelle aucune croissance cellulaire n'est observée. A partir de ce test, les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau IV**, qui montre que la souche (A3-1) présente une résistance au plomb et au chrome alors qu'elle est très sensible au mercure.

Tableau IV: Les valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour la culture *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence de différentes concentrations de Pb, Hg et Cr (VI).

Métal	Chrome	Mercure	Plomb
Concentration en mg/L	DO _{t24} – DO _{t0}	DO _{t24} – DO _{t0}	DO _{t24} – DO _{t0}
0	0,6305	0,5193	0,6057
10	0,3091	-0,02	0,5155
20	0,1993	-0,0504	0,5470
30	0,0964	-0,0205	0,5668
40	0,1552	-0,0101	0,4723
50	0,0298	-0,0240	0,5786
60	0,00281	-0,0430	0,4596
70	0,0003	-0,0327	0,5306
80	-0,0332	-0,0302	0,5667
90	-0,0748	-0,030	0,5476
100	-0,0726	-0,0284	0,3305

En présence du chrome, *B. megaterium* est capable de croître à des concentrations inférieures à 70 mg/L (correspondant à la CMI) avec une croissance très faible dans cette valeur, alors que les concentrations supérieures à 80 mg/L sont létales et provoquent un effet toxique sur la bactérie.

La concentration minimale inhibitrice pour le plomb n'a pas pu être définie parce que cette bactérie tolère jusqu'à 100 mg/L, alors que cette souche est sensible à toutes les concentrations du mercure où aucune croissance bactérienne n'est observée.

Guo et al., (2010), ont montré que la souche *Bacillus* sp. L14 a un degré élevé de résistance aux métaux lourds, en particulier au Cu (II), Pb (II) et au Cr (VI) avec une CMI égale à 10 mM, 12 mM, 4 mM, respectivement dans le milieu LB contenant les ions des métaux.

Alors que, **Raja et al., (2006)**, ont trouvé que *P. aeruginosa* possède un très haut niveau de résistance aux différents métaux lourds dont les valeurs de CMI variaient de 100 à 800 ppm. Ces métaux notamment Pb, Cd et Cr avaient une CMI égale à 800 ppm, 500 ppm et 400 ppm, respectivement. De plus, **Kathiravan et al., (2011)**, ont démontré que les trois espèces bactériennes *Bacillus* sp., *E. coli* et *Alcaligenes* sp. isolées à partir des sites contaminés par le Cr (VI) avaient la capacité de résister au chrome avec des CMI égales à 50, 40 et 35 mg/L, respectivement. Ces résultats indiquent une bonne résistance pour *Bacillus* sp.

Dans une autre étude, **Cheng et Li, (2009)**, ont testé 08 souches bactériennes du genre *Bacillus* sp. pour évaluer leur résistance vis-à-vis de différents métaux lourds notamment : le Cr (VI), Cd (II), Cu (II), Pb (II) et Mn (II) à des concentrations allant de 500 mg/L à 2000 mg/L avec des valeurs de CMI qui variaient d'environ 50 mg/L au Cu (II) à 2500 mg/L au Cr (VI), alors que *B. megaterium* et *B.adius* pourraient tolérer des concentrations de 2500 mg/L et 2000 mg/L de Cr (VI) ainsi qu'une concentration de 2000 mg/L de Pb (II).

Plusieurs travaux ont montré la résistance élevée des micro-organismes isolés à partir des sites contaminés au chrome. C'est le cas de *Bacillus* et *Arthrobacter* qui ont la capacité de résister même à des concentrations élevées allant jusqu'à 1000 mg/L (**Xiao et al., 2017**), la souche *B. cereus* avait une CMI plus faible égale à 1500 µg/ml (**Singh et al., 2013**) et *B. sphaericus* tolère jusqu'à 800 mg/L de Cr (VI) (**Pal et Paul, 2004**). Par ailleurs, **He et al., (2011)**, ont trouvé que la bactérie *Lysinibacillus fusiformis* ZC1 est très sensible au Hg (II) avec une CMI de 0.05 nM.

Cependant, la comparaison de nos résultats avec les valeurs rapportées dans la littérature est difficile, en raison des variations dans les conditions expérimentales y compris la méthode de détermination de la CMI (en milieu liquide, en milieu solide en utilisant des disques ou par incorporation), type de milieu choisi (milieu riche ou pauvre), la nature du sel métallique utilisé, et le type de bactéries utilisées (espèces), car tous ces facteurs peuvent avoir une grande influence sur la toxicité des métaux et par conséquent sur les valeurs des CMI.

De plus, **Gadd, (1990)**, suggère que la capacité de résistance vis-à-vis des métaux lourds diffère d'une souche à une autre selon le mécanisme utilisé par la souche bactérienne pour se protéger contre l'action de ce métal, comme la biosorption par la biomasse cellulaire, le transport actif, la

liaison par des molécules cytosoliques et des précipitations ainsi que des réactions d'oxydoréduction.

II. Optimisation des conditions de croissance et de réduction du Cr (VI)

1. Effet de la biomasse

Ce test permet d'évaluer l'effet des différents pourcentages de l'inoculum (de 5%, 10% et 12,5%) de la souche (A3-1) sur la croissance bactérienne qui ont été séparément testés dans du bouillon nutritif en absence et en présence d'une concentration donnée du chrome hexavalent (30 mg/L), par la mesure de la densité optique à 600 nm (**Figure 4**).

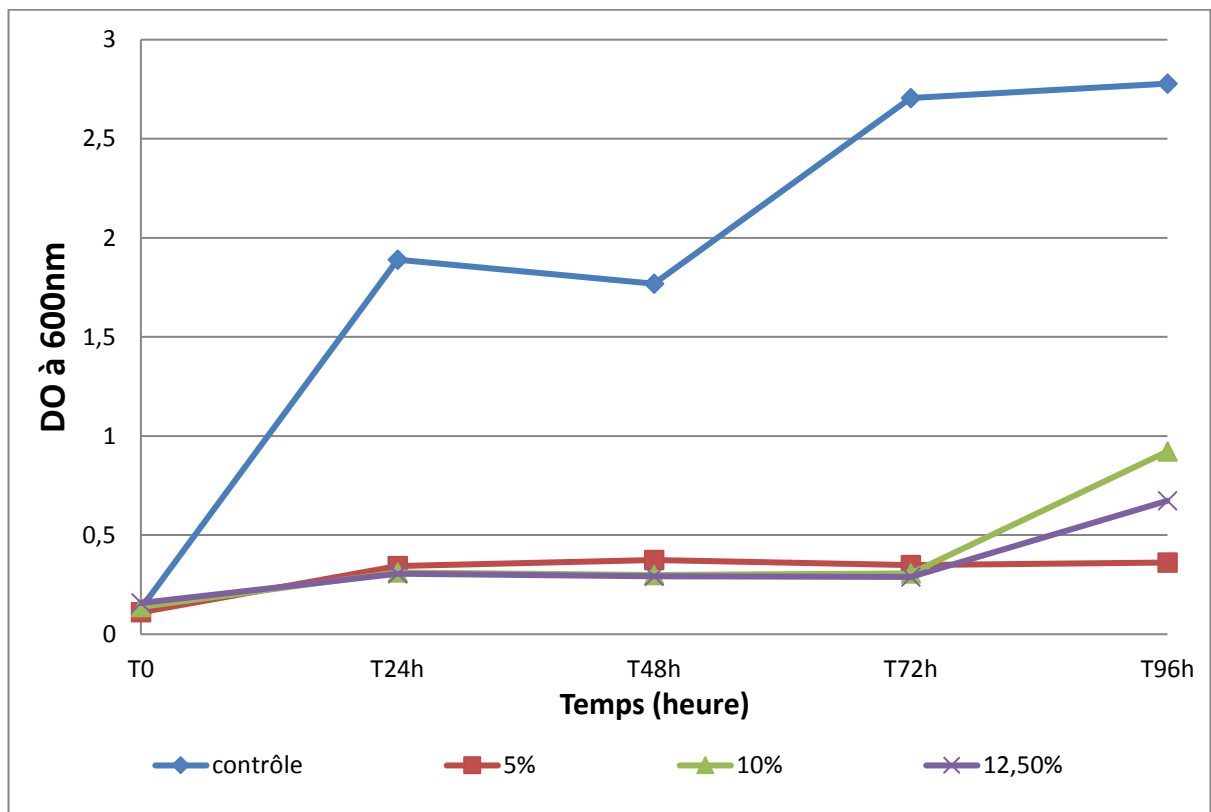


Figure 4: Effet de différents pourcentages d'inoculum de *Bacillus megaterium* (A3-1) sur sa croissance en présence de 30 mg/L du Cr (VI) dans le bouillon nutritif à 37°C.

De manière générale, on remarque d'après les résultats obtenus que la croissance est très élevée et qui atteint en 96h le maximum de la croissance ($DO_{600nm} = 2,77$), la croissance cellulaire a commencé durant les premières heures d'incubation.

Cependant, la croissance de *B. megaterium* à différents pourcentages d'inoculation avec une concentration initiale du métal de 30 mg/L était faible durant les trois premiers jours d'incubation. Après 72h d'incubation, la croissance cellulaire augmente d'une façon remarquable avec les

pourcentages de biomasse 10% et 12,5%. Le maximum de croissance obtenu ($DO_{600nm} = 0,922$) pour un inoculum de 10%. Cette faible croissance durant les trois premiers jours d'incubation reflète un état physiologique affaibli par la présence des ions chromate, ce qui laisse supposer que le métal induit un système de résistance spécifique chez la souche bactérienne, il s'agit probablement d'un système inductible.

En parallèle de l'étude de la cinétique de la croissance. Nous avons étudié l'influence du pourcentage de l'inoculum sur la capacité de *B. megaterium* à réduire le Cr (VI) à une concentration initiale de 30 mg/L. L'élimination est suivie par la mesure de la concentration du chrome (VI) dans milieu de culture durant 72h.

Les résultats montrés dans la **figure 5**, montrent que la concentration du métal diminue d'une façon très importante avec l'augmentation du pourcentage de la biomasse (5%, 10% et 12,5%), la réduction du chrome est très rapide entre l'intervalle de t_0 à t_{24h} , suivie par une diminution de la vitesse de la réaction, qui se stabilise et atteint le maximum de réduction du chrome après t_{48h} pour les pourcentages d'inoculum de (10% et 12,5%), donc on peut dire que la réduction du Cr (VI) et la croissance bactérienne sont inversement proportionnelles.

Une élimination totale du Cr (VI) a été notée avec les pourcentages d'inoculum 10% et 12% après 48 heures d'incubation. Ces résultats peuvent être expliqués par la disponibilité d'un nombre plus élevé de sites de liaison du métal lorsque la biomasse est importante dans le milieu.

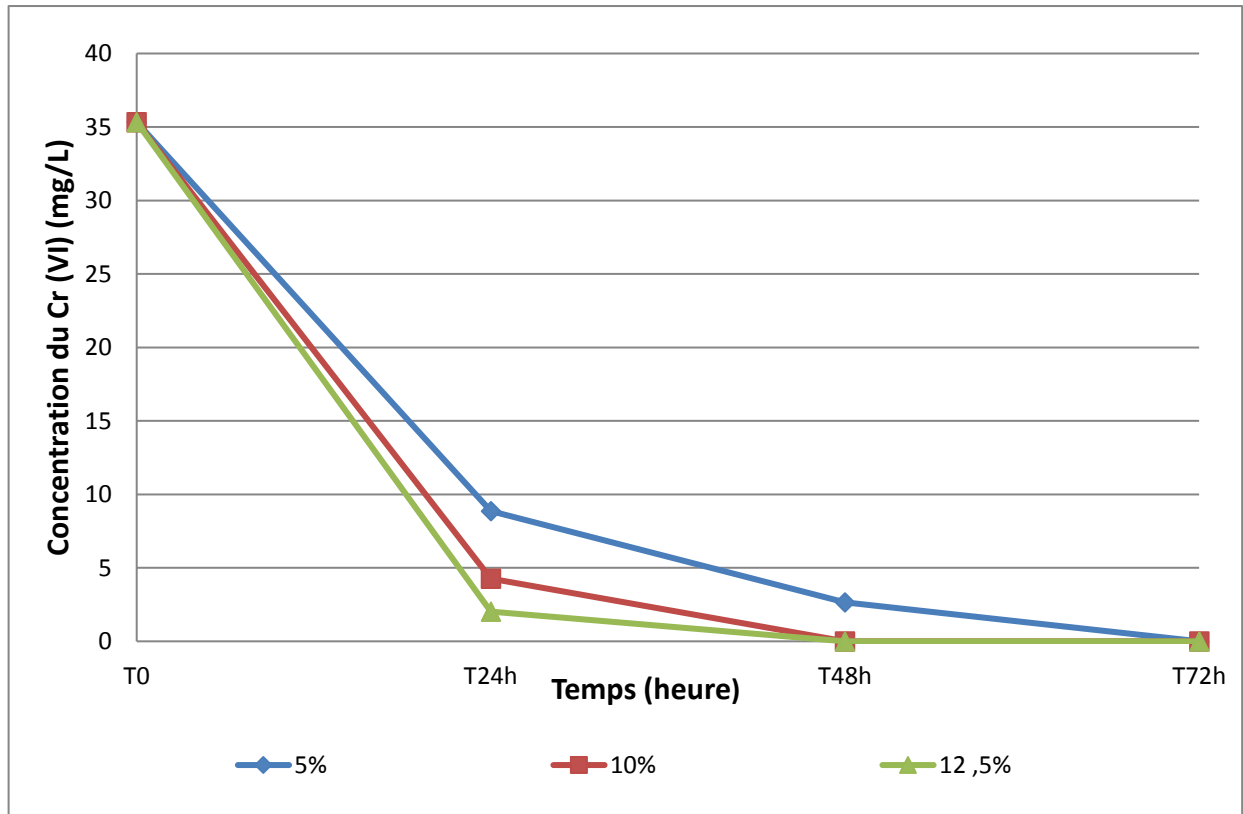


Figure 5 : L'effet de différents pourcentages d'inoculum de *Bacillus megaterium* (A3-1) sur l'élimination du Cr (VI) en présence d'une concentration initiale 30 mg/L à 37°C en fonction de temps.

Des études similaires rapportées par **Emadzadeh et al., (2016)**, ont étudié l'effet des différents volumes d'inoculum (5, 10, 15 et 20 mL) de la souche *B. cereus* pour la réduction du Cr (VI) en présence d'une concentration de 50 mg/L du Cr (VI). Les résultats indiquent que l'augmentation du volume de la biomasse de 5 ml à 20 ml affecte le taux d'élimination du Cr (VI), qui atteint après 24h d'incubation un maximum de la réduction (100%) pour l'inoculum de 20 ml.

De plus, **Xiao et al., (2017)**, ont montré que la réduction du Cr (VI) par *Bacillus* sp. FY1 et *Arthrobacter*.sp spXZ2 augmente avec l'accroissement de la concentration de l'inoculum de $0,1 \times 10^8$ à 1×10^8 Cellules /ml, avec un taux de réduction de 95,0% et 92,6%, respectivement. De même, **Pal et Paul, (2004)**, ont observé que la réduction du chromate par *B. sphaericus* augmente avec l'augmentation de la densité cellulaire.

Dans le même contexte, **Sethuraman et Balasubramanian, (2010)**, ont étudié l'effet de la concentration de la biomasse sur la biosorption des ions métalliques dans un système discontinu par *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *E. cloaca*. Cette étude a révélé que l'efficacité de l'élimination des ions du Cr (VI) augmentait avec l'augmentation de la concentration de la biomasse. Cependant,

l'augmentation de la concentration de l'inoculum augmente le nombre des sites de liaison ce qui augmente la biosorption des ions Cr (VI). Une diminution du taux de réduction du Cr (VI) a été signalée lorsque la concentration de la biomasse d'*E. cloacae* diminue de façon significative (Kathiravan et al., 2011).

2. Effet du pH

Ce test permet de suivre la croissance de la souche *B. megaterium* en présence du chrome et d'étudier sa capacité à réduire le chrome hexavalent. Pour évaluer l'effet du pH sur la cinétique de réduction de ce métal, nous avons choisi les pH suivants : 5, 6, 7, 8. Les résultats sont illustrés dans les **Figures 6 et 7**.

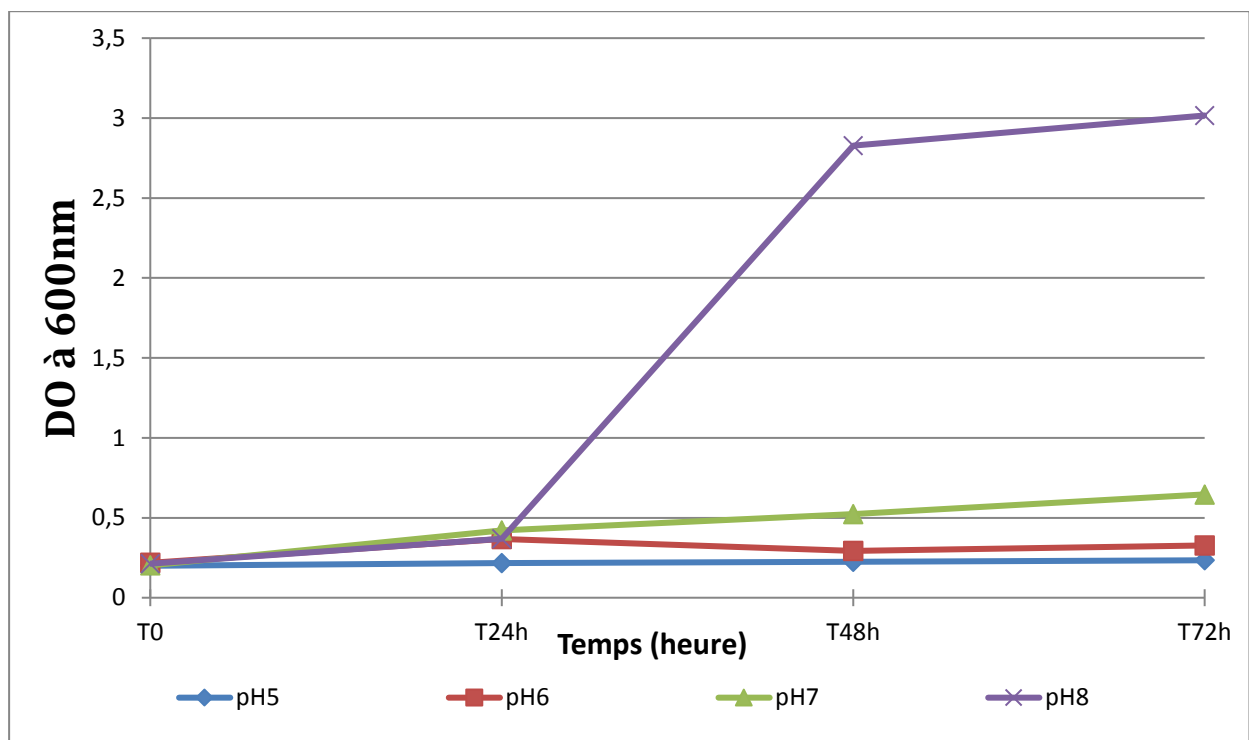


Figure 6 : Effet de différents pH sur la croissance de *Bacillus megaterium* en présence d'une concentration de 30 mg/L du Cr (VI) dans le bouillon nutritif à 37°C.

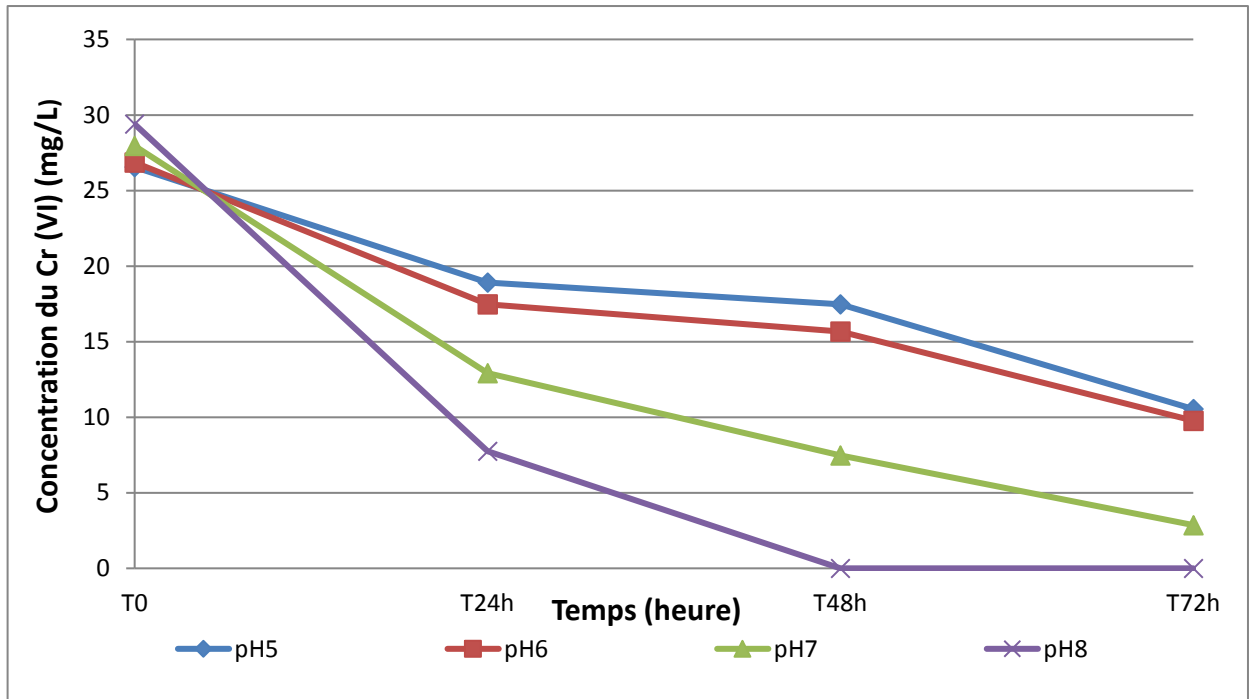


Figure 7 : Effet de différents pH sur l'élimination du Cr (VI) en présence d'une concentration de 30 mg/L à 37°C en fonction de temps.

D'après les figures 6 et 7, les résultats indiquent qu'avec l'augmentation graduelle du pH de 5 à 8, la croissance microbienne augmente parallèlement, ainsi que le taux de chrome réduit qui a été calculé respectivement, comme étant égal à 60,30%, 63,62%, 89,77% et 100%.

A pH 8, la souche développe le mieux en présence du chrome (VI) et réduit totalement au bout de 48 heures. Dans le cas où une adsorption des ions chromates est mise en jeu, l'élimination du métal dans pH acide est faible, cela peut être dû à la diminution des forces d'attraction électrostatiques entre les ions du chrome et les sites fonctionnels de la biomasse de *B. megaterium*, ou à la compétition entre les ions H^+ et les ions positifs du métal. Cependant si la réduction du Chrome est médiée par des enzymes. Le changement du pH affectera le degré d'ionisation de cette enzyme, en modifiant la conformation des protéines ce qui affecte l'activation enzymatique (Belattmania *et al.*, 2015).

Sethurman et Balasubramanian, (2010), ont été démontré que les souches *E. cloacae* et *P. aeruginosa* ont la capacité d'adsorber le chrome dans une gamme de pH de 2 à 9 avec une réduction maximal dans les pH alcalins, due à l'activité des ions hydrogène, car à faibles valeurs de pH, les groupes fonctionnels transfèrent les ions H^+ ce qui indique que la majorité des sites de liaison étaient occupés. Lorsque le pH augmente, la concentration des ions H^+ diminue et la surface de la biomasse chargée négativement peut interagir avec les ions métalliques chargés positivement.

Plusieurs travaux ont montré la réduction du Cr (VI) dans des conditions alcalines, par des microorganismes isolés à partir des sites pollués. C'est le cas des *Bacillus sp.* qui sont des espèces réductrices du Cr (VI), pour lesquelles les conditions optimales de réduction sont à pH 7, et une température de 30°C. De même, **Wang et Shen, (1995)**, ont montré qu'*E. coli* a la capacité de réduire le Cr dans une gamme de pH de 3 à 8 et une gamme de température de 10 C° à 45C° avec un taux, de réduction maximal dans un pH 7 et une température d'environ 36 C°.

D'autres études ont montré que *B. cereus* a la capacité de réduire le Cr (VI) dans un milieu à une concentration de 1000 µg/ml en Cr, avec un maximum à pH 8, où plus de 70% de l'activité de réduction au pH optimal (pH=8) est perdue lorsque le pH est changé à 5,0 ou 11,0. Ainsi, la réduction du Cr (VI) a légèrement diminué avec l'augmentation ou la diminution du pH de 8,0 (**Singh et al., 2013**). Tandis que, **Aslam et al., (2016)**, suggèrent que le changement progressif du pH neutre au basique d'un lixiviat favorise la réduction du Cr par *Bacillus megaterium*-ASN3. Ces résultats indiquent que la variation des valeurs du pH initial induit une variation de la capacité d'élimination du Cr (VI) quel que soit le mécanisme impliqué, ce qui confirme que le pH est un facteur important pour la performance des procédés à grande échelle.

3. Effet de l'agitation

Ce test permet d'étudier l'influence de l'agitation sur la croissance de *B. megaterium* et la réduction du Cr (VI). Les résultats obtenus sont présentés dans les **figures 8 et 9**.

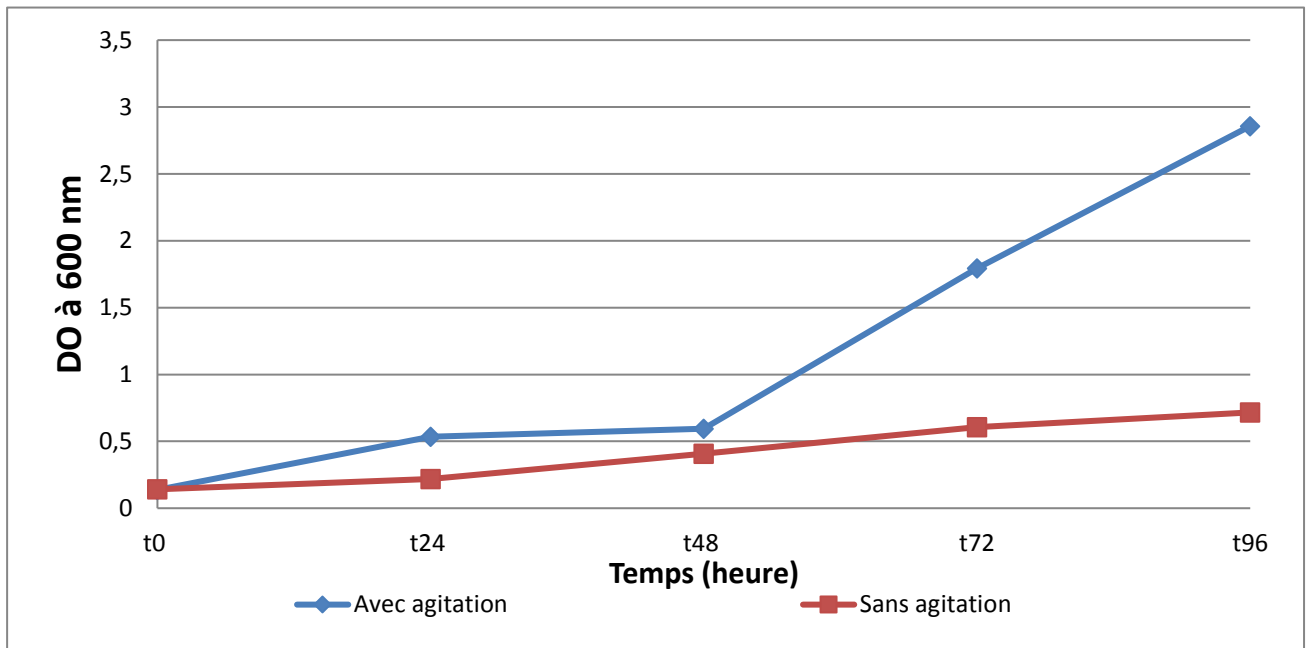


Figure 8 : Effet de l'agitation sur la croissance de *Bacillus megaterium* en présence d'une concentration de 30 mg/L du Cr (VI) dans le bouillon nutritif à 37°C.

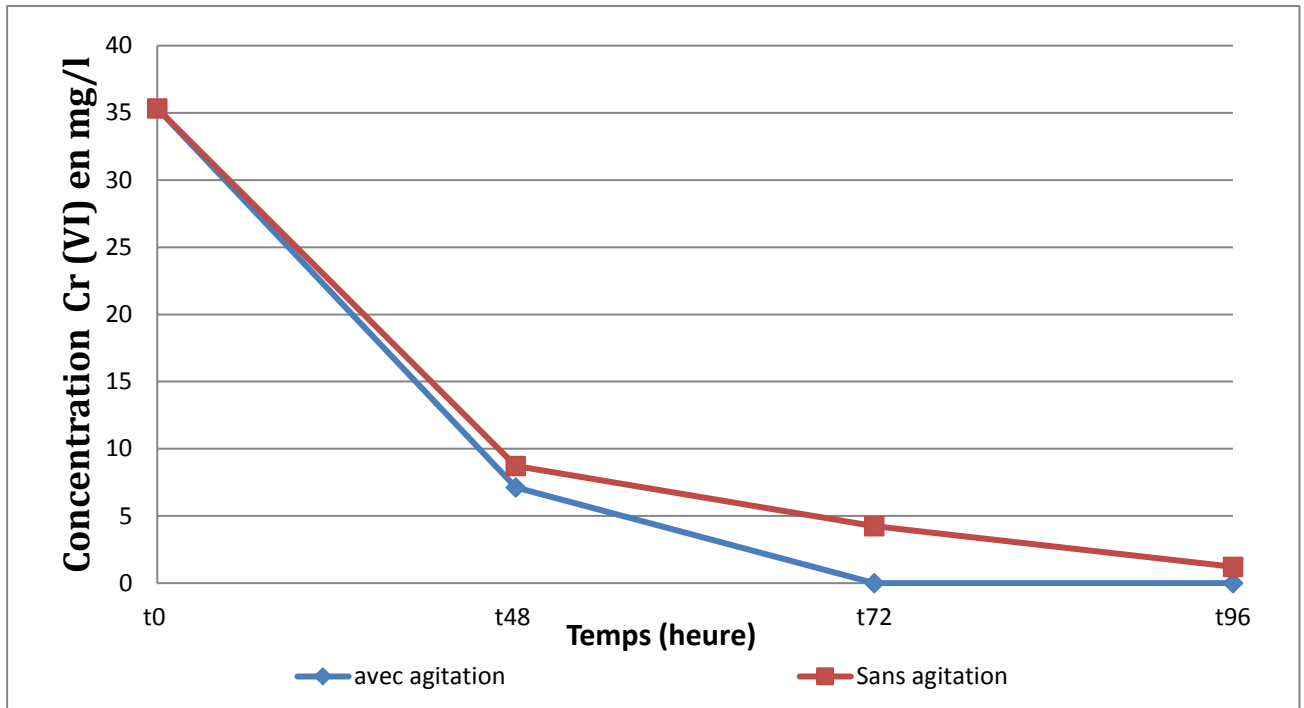


Figure 9 : Effet de l'agitation sur l'élimination du Cr (VI) en concentration initiale 30 mg/L à 37°C en fonction de temps.

Nous remarquons qu'après un temps d'incubation de 24h, la croissance microbienne et la réduction du chrome s'initient simultanément dans les deux cultures de *B. megaterium* incubées l'une sous agitation et l'autre sans agitation, avec un niveau plus élevé de croissance et de réduction dans la culture agitée. Ce qui explique que l'agitation affecte indirectement le niveau d'aération qui affecte à son tour, la croissance bactérienne et par conséquent la réduction du métal.

La réduction complète est notée à s'accélère dans les 72h d'incubation sous agitation à 110 rpm, cette bonne réduction (100%) suggère que sous agitation, un bon contact a été développé entre l'ion métallique en solution et les sites de liaison sur la surface bactérienne, Ce qui a favorisé le transfert efficace des ions du métal sur les sites absorbants.

Des résultats analogues ont également été signalés par d'autres équipes de recherche, notamment, **Das et al., (2014)**, qui ont montré que la souche *B. amyloliquefaciens* a une tolérance relativement élevée au Cr (≤ 900 mg/L) et un taux de réduction rapide de 2,22 mg/L/h est qui présentait une réduction maximale du Cr à une vitesse d'agitation de 125rpm.

De même, **Ibrahim et al., (2011)**, ont également évalué la réduction du Cr par *Bacillus* sp KSUCr5 dans un milieu alcalin avec la variation de la vitesse d'agitation de 0 à 300, où il a été observé que la réduction maximale s'effectue à 150 rpm avec la diminution de la réduction du Cr de part et d'autre de cette valeur. L'aération est donc, un autre facteur limitant à contrôler

rigoureusement durant les procédés de bioremediation industrielles particulièrement lors de l'utilisation des bactéries aérobies stricte comme dans le cas de *B. megaterium*.

III. Bioaccumulation du chrome (VI)

Ce test nous avons permis d'évaluer la capacité de *Bacillus megaterium* (A3-1) à accumuler le Cr (VI) après 72h d'incubation à 37°C en présence d'une concentration initiale de 30 mg/L en Cr (VI), en comparant avec le test témoin constitué d'une culture dans les mêmes conditions mais en absence de métal. Le dosage par la méthode colorimétrique du Cr (VI) intracellulaire dans la souche bactérienne a donné les résultats présentés ci-dessous dans la **figure 10**.

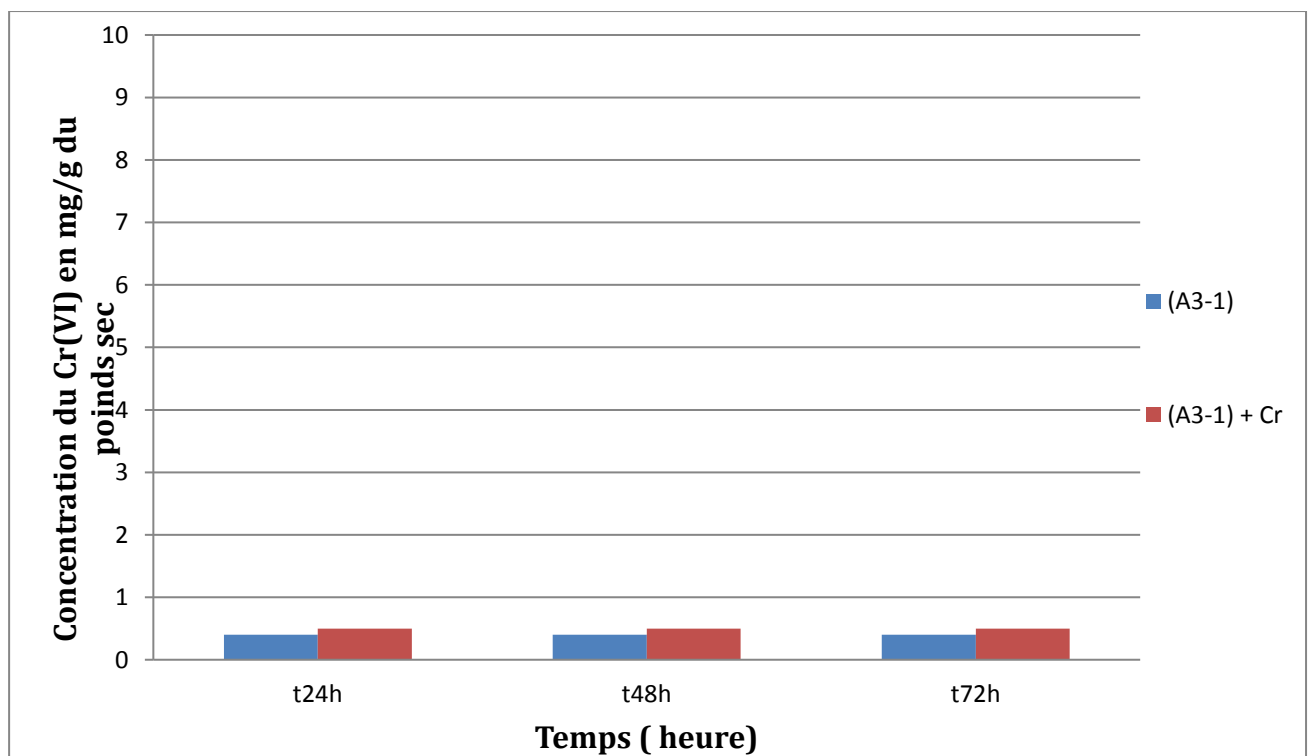


Figure 10: Dosage du Cr intracellulaire dans la souche *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence de 30 mg/L de Cr dans le bouillon nutritif en fonction du temps à 37°C.

Ces résultats indiquent que l'élimination du Cr (VI) par notre souche, ne met pas en jeu un processus d'accumulation, ce qui laisse supposer qu'un autre mécanisme est impliqué tel que la biosorption. Le genre *Bacillus* a montré une capacité d'absorption importante en raison de la composition des spores et des multiples enveloppes supplémentaires. La présence de structures de surface dans la paroi cellulaire de *Bacillus*, telles que les paracrystallines, les protéines et l'exopolysaccharide, favorise l'interaction avec des ions métalliques (Dadrasnia *et al.*, 2015).

Nos résultats sont proches de ceux des travaux de **Op et al., (2015)**, qui ont démontré que les deux souches *P. aeruginosa* et *B. subtilis* sont capables d'adsorber efficacement le chrome dans des conditions optimales de pH et de température, mais il s'est avéré que le *B. subtilis*, (Gram positif) était plus efficace que *P. aeruginosa*, (Gram négatif), ceci est dû à la présence des polymères appelés teichoïque et acide teichuronique à la surface des bactéries Gram+, ces polymères sont liés par des liaisons covalentes au peptidoglycane ou attachées avec les lipides de la membrane cytoplasmique, créant une charge négative sur la surface des cellules bactériennes, ce qui favorise la liaison ionique des métaux.

Ainsi, **Oves et al., (2013)**, ont démontré que la souche *B. thuringiensis* OSM29 était capable d'éliminer différents métaux tels que Cd, Cu, Pb, Ni et Cr grâce à la présence des groupes fonctionnels identifiés sur leur surface bactérienne par la technique FTIR, y compris les groupes amine, carboxyle, hydroxyle et carbonyle qui pourraient être impliqués dans la biosorption de ces métaux. Par ailleurs, **Dadrasnia et al., (2015)**, ont étudié la biosorption du chrome à différentes concentrations par *B. salmalaya* 139SI en utilisant des cellules vivantes et mortes, les résultats ont montré que cette souche a la capacité d'adsorber jusqu'à 20,35 mg/g du chrome, avec une forte sorption par des cellules mortes que celle des cellules vivantes.

De même, **Quintelas et al., (2008)**, a montré qu'un biofilm de *B. coagulans* a permis de réduire la teneur en Cr avec des valeurs d'absorption de 1,50, 1,98 et 5,34 mg/g pour les concentrations initiales de chrome 10, 50, et 100 mg/L, respectivement.

Conclusion

L'objectif de ce travail était d'étudier l'influence de quelques paramètres (la densité de la biomasse, pH et l'agitation), sur la capacité de la souche *Bacillus megaterium* (A3-1) isolée à partir d'effluent de la tannerie, à résister et à croître en présence d'une concentration de 30 mg/L de Cr (VI) et sur sa capacité à éliminer le chrome présent dans le milieu.

D'après les résultats, nous avons montré que la souche *B. megaterium* (A3-1) présente une résistance remarquable pour certains métaux lourds; y compris le plomb et le chrome avec un degré de tolérance variable, tandis qu'elle présente une haute sensibilité au mercure.

Cette bactérie montre une croissance optimale ainsi qu'une réduction complète (100%) du Cr (VI) après une période d'incubation de 72h, à pH alcalin et atteint le maximum à pH8, avec un pourcentage d'inoculation de 10%, et une agitation modérée à 37°C. Ces résultats illustrent le potentiel de *B. megaterium* à éliminer le chrome et ce en développant un mécanisme de résistance et de réduction, où les ions chromate sont adsorbés sur la paroi cellulaire ou réduits par des enzymes, et non accumulés à l'intérieur de la cellule. L'élimination du chrome (VI) a été confirmée en mettant en œuvre son analyse par la méthode colorimétrique par le 1,5 diphénylcarbazide.

On peut conclure que *B. megaterium* pourrait être considéré à la mise au point d'un matériau biologique dans la biorémediation des sites pollués pour l'élimination du chrome (VI). Ce procédé est moins coûteux, du fait de la disponibilité de la souche sur site et de son renouvellement perpétuel, comparé aux coûts relativement élevés des techniques de dépollution physico-chimiques.

Il s'avère nécessaire de mentionner que ces résultats ouvrent large, les perspectives pour d'autres recherches, tant au niveau de la connaissance scientifique, qu'à celui d'une possibilité d'optimiser un milieu favorable pour utiliser cette bactérie à grande échelle dans le traitement biologique des effluents des tanneries pour minimiser l'effet toxique du chrome (VI). Ainsi, il serait intéressant de mieux comprendre les mécanismes qui régissent sur le processus de réduction du chrome (VI) par des bactéries résistantes au Cr (VI), ce qui augmente l'intérêt de cette souche dans les autres applications biotechnologiques.

A

Aboulhassan, M. A., Souabi, S., Yaacoubi, A., Zaim, N., & Bouthir, F. Z. (2008). Les effluents de tannerie caractérisation et impact sur le milieu marin. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 21(4), 463-473.

Ahemad, M. (2014). Bacterial mechanisms for Cr (VI) resistance and reduction: an overview and recent advances. *Folia Microbiologica*, 59(4), 321-332.

Al-Battashi H., Joshi S. J., Pracejus B., & Al-Ansari, A. (2016). The geomicrobiology of chromium (VI) pollution: microbial diversity and its bioremediation potential. *The Open Biotechnology Journal*, 10(1).

Alvarez, A. H., Moreno-Sánchez, R., & Cervantes, C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181(23), 7398-7400.

Arab, L., Boutahala, M., & Djellouli, B. (2014). Étude de l'élimination du Cr (VI) par l'oxyde mixte obtenu par calcination de l'hydroxyde double lamellaire MgAl. *Comptes Rendus Chimie*, 17.

Arif, M., Hussain, J., & Hussain, I. (2014). Occurrence of Trace and Toxic metals in River Narmada. *EQA-International Journal of Environmental Quality*, 14(14), 31-41.

Aslam, S., Hussain, A., & Qazi, J. I. (2016). Dual action of chromium-reducing and nitrogen-fixing *Bacillus megaterium*. *3 Biotech*, 6(2), 1-11.

Avudainayagam, S., Megharaj, M., Owens, G., Kookana, R. S., Chittleborough, D., & Naidu, R. (2003). Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 53-91. Springer New York.

B

Belattmania, Z., Zrid, R., Reani, A., Tahiri, S., Eddaoui, A., Loukili, H., ... & Sabour, B. (2015). Phycoremediation of hexavalent chromium in simulated wastewater by *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau (*Ochrophyta, Phaeophyceae*).

Bhateria, R., & Dhaka, R. (2017). Biological strategies for detoxification of hexavalent chromium: Review Article. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 8 (1), 35 – 48.

Brandhuber, P., & Frey, M. (2005). Low-Level Hexavalent Chromium Treatment Options. American Water Works Association.

C

Carlos, F. S., Giovanella, P., Bavaresco, J., de Souza Borges, C., & d'Oliveira Camargo, F. A. (2016). A comparison of microbial bioaugmentation and biostimulation for hexavalent chromium removal from wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(6), 1-11.

Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 335-347.

Cheung, K. H., & Gu, J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(1), 8-15.

Cheng, G., & Li, X. (2009). Bioreduction of chromium (VI) by *Bacillus sp.* isolated from soils of iron mineral area. *European Journal of Soil Biology*, 45(5), 483-487.

Chowdhury, P. (2009). Polymers for the Extraction of Chromium—Role of Polymers in the Removal and Recovery of Chromium from Wastewater. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 46(10), 1030-1038.

D

Dadrasnia, A., Chuan Wei, K. S., Shahsavari, N., Azirun, M. S., & Ismail, S. (2015). Biosorption Potential of *Bacillus salmalya* Strain 139SI for Removal of Cr (VI) from Aqueous Solution. *International journal of environmental research and public health*, 12(12), 15321-15338.

Das, N., & Mathew, L. (2011). Chromium pollution and bioremediation: an overview. In *Biomangement of Metal-Contaminated Soils* (pp. 297-321). Springer Netherlands.

Das, N., Vimala, R., & Karthika, P. (2008). Biosorption of heavy metals—an overview. *India Journal of Biotechnology*, 7, 159-169.

Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A et Thatoi, H. (2014). Investigation on mechanism of Cr (VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112-121.

Dhal, B., Thatoi, H. N., Das, N. N., & Pandey, B. D. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 250, 272-291.

E

Emadzadeha, M., Pazoukib, M., Abdollahzadeh Sharghib, E., & Taghavia, L. (2016). Experimental study on the factors affecting hexavalent chromium bioreduction by *Bacillus cereus*. *Int J Eng Trans B*, 29(02), 152-159.

F

Fellenz, N., Perez-Alonso, F. J., Martin, P. P., García-Fierro, J. L., Bengoa, J. F., Marchetti, S. G., et Rojas, S. (2017). Chromium (VI) removal from water by means of adsorption-reduction at the surface of amino-functionalized MCM-41 sorbents. *Microporous and Mesoporous Materials*, 239, 138-146.

Focardi, S., Pepi, M., & Focardi, S. E. (2013). Microbial reduction of hexavalent chromium as a mechanism of detoxification and possible bioremediation applications. *Agricultural and Biological Sciences, Biodegradation-Life of Science*, 12, 321-347.

G

Gadd, G. M. (1990). Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46(8), 834-840. ISO 690

Ghosh, A., Dastidar, M. G., & Sreerishnan, T. R. (2017). Bioremediation of chromium complex dyes and treatment of sludge generated during the process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 448-460.

Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W et He, Y. (2010). Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource technology*, 101(22), 8599-8605.

H

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., & Boudabous, A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, 64(1), 7-15.

He, M., Li, X., Liu, H., Miller, S. J., Wang, G., & Rensing, C. (2011). Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2), 682-688.

Hlihor, R. M., Bulgariu, L., Sobariu, D. L., Diaconu, M., Tavares, T., & Gavrilescu, M. (2014). Recent advances in biosorption of heavy metals: support tools for biosorption equilibrium, kinetics and mechanism. *Revue Roumaine de Chimie*, 59(6-7), 527-538.

I

Ibrahim, A. S., El-Tayeb, M. A., Elbadawi, Y. B., & Al-Salamah, A. A. (2011). Bioreduction of Cr (VI) by potent novel chromate resistant alkaliphilic *Bacillus sp.* strain KSUCr5 isolated from hypersaline Soda lakes. *African Journal of Biotechnology*, 10(37), 7207-7218.

J

Jacobs, J. A., & Testa, S. M. (2005). Overview of chromium (VI) in the environment: background and history, 1-21.

Joutey, N. T., Sayel, H., Bahafid, W., & El Ghachtouli, N. (2015). Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Volume 233, 45-69.

K

Kalidhasan, S., Kumar, A. S. K., Rajesh, V., & Rajesh, N. (2016). The journey traversed in the remediation of hexavalent chromium and the road ahead toward greener alternatives—A perspective. *Coordination Chemistry Reviews*, 317, 157-166.

Kamaludeen, S. P. B., Arunkumar, K. R., & Ramasamy, K. (2003). Bioremediation of chromium contaminated environments. *India Journal of Experimental Biology*, 41, 972-985.

Kamiński, W., & Kwapiński, W. (2000). Applicability of liquid membranes in environmental protection. *Polish Journal of Environmental Studies*, 1, 9-37.

Kathiravan, M. N., Karthick, R., & Muthukumar, K. (2011). Ex situ bioremediation of Cr (VI) contaminated soil by *Bacillus sp.*: batch and continuous studies. *Chemical engineering journal*, 169(1), 107-115.

Kavita, B., & Keharia, H. (2012). Reduction of hexavalent chromium by *Ochrobactrum* intermedium BCR400 isolated from a chromium-contaminated soil. *3 Biotech*, 2(1), 79-87.

Kratochvil, D., & Volesky, B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, 16(7), 291-300.

Krishna, K. R., & Philip, L. (2005). Bioremediation of Cr (VI) in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 121(1), 109-117.

Kyzas, G. Z., Fu, J., & Matis, K. A. (2013). The change from past to future for adsorbent materials in treatment of dyeing wastewaters. *Materials*, 6(11), 5131-5158.

L

Lyon D. Y. et Vogel T. M. (2013). Bioaugmentation for Groundwater Remediation: An Overview, In: *Bioaugmentation for Groundwater Remediation*, (ed) Stroo H. F., Leeson A., Ward C. H. New York. p. 1-38.

M

Mahjoub, B., Fkih, I., & Ncibi, M. C. (2015). Élimination du chrome hexavalent des solutions aqueuses par adsorption sur feuilles brutes de *Posidonia oceanica* (L.): cinétiques, équilibres et modélisation.

Baetjer A, J. Birmigham, D., E. Enterline, P., Mertz, W., Pierce J. (1974). Chromium. National Academy of Sciences. library of cataloging: p 4.

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

Meli, K. (2009). Microbial Cr (VI) reduction in indigenous cultures of bacteria: characterization and modelling. Thèse de doctorat. University of Pretoria.

Mishra, R., Sinha, V., Kannan, A., & Upreti, R. K. (2012). Reduction of chromium-VI by chromium resistant lactobacilli: a prospective bacterium for bioremediation. *Toxicology international*, 19(1), 25.

Mishra, S., & Bharagava, R. N. (2016). Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 34(1), 1-32.

Mohanty, M., & Patra, H. K. (2011). Attenuation of chromium toxicity by bioremediation technology. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 210, 1-34.

Morais, P. V., Branco, R., & Francisco, R. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant. *Biometals*, 24(3), 401-410.

N

Nhari, F., Sbaa, M., Vasel, J. L., Fekhaoui, M., & El Morhit, M. (2014). Soil contamination of the landfill uncontrolled by heavy metals: case of the landfill of Ahfir-Saidia (Eastern Morocco). *J Mater Environ Sci*, 5(5), 1477-1484.

O

Op, A., Adefisan, A. E., Aransiola, S. A., & Damisa, D. (2015). Biosorption of Chromium by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Waste Dump Site. *Expert Opin Environ Biol*, 4:1.

Oves, M., Khan, M. S., & Zaidi, A. (2013). Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi journal of biological sciences*, 20(2), 121-129.

Owlad, M., Aroua, M. K., Daud, W. A. W., & Baroutian, S. (2009). Removal of hexavalent chromium-contaminated water and wastewater: a review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 200(1-4), 59-77.

P

Pal, A., Datta, S., & Paul, A. K. (2013). Hexavalent chromium reduction by immobilized cells of *Bacillus sphaericus* AND 303. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 505-512.

Pal, A., & Paul, A. K. (2004). Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Microbiological Research*, 159(4), 347-354.

Pazos, M., Branco, M., Neves, I. C., Sanromán, M. A., & Tavares, T. (2010). Removal of Cr (VI) from Aqueous Solutions by a Bacterial Biofilm Supported on Zeolite: Optimisation of the Operational Conditions and Scale-Up of the Bioreactor. *Chemical Engineering & Technology*, 33(12), 2008-2014.

Pechova, A., & Pavlata, L. (2007). Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinarni Medicina-Praha*, 52(1), 1.

Peralta, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., & Parsons, J. G. (2001). Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and toxicology*, 66(6), 727-734.

Polti, M. A., Amoroso, M. J., & Abate, C. M. (2011). Intracellular chromium accumulation by *Streptomyces sp.* MC1. *Water, Air, & Soil Pollution*, 214(1-4), 49-57.

Pradhan, S. K., Singh, N. R., Rath, B. P., & Thatoi, H. (2016). Bacterial chromate reduction: A review of important genomic, proteomic, and bioinformatic analysis. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-45.

Q

Quintelas, C., Fernandes, B., Castro, J., Figueiredo, H., & Tavares, T. (2008). Biosorption of Cr (VI) by a *Bacillus coagulans* biofilm supported on granular activated carbon (GAC). *Chemical Engineering Journal*, 136(2), 195-203.

R

Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compound. *Biometals*, 21(3), 321-332.

Raja, C. E., Anbazhagan, K., & Selvam, G. S. (2006). Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 577-585.

S

Saha, R., Mukherjee, K., Saha, I., Ghosh, A., Ghosh, S. K., & Saha, B. (2013). Removal of hexavalent chromium from water by adsorption on mosambi (*Citrus limetta*) peel. *Research on Chemical Intermediates*, 39(5), 2245-2257.

Saha, R., Nandi, R., & Saha, B. (2011). Sources and toxicity of hexavalent chromium. *Journal of Coordination Chemistry*, 64(10), 1782-1806.

Sethuraman, P., & Balasubramanian, N. (2010). Removal of Cr (VI) from aqueous solution using *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2(6), 1811-1825.

Singh, N., Verma, T., & Gaur, R. (2013). Detoxification of hexavalent chromium by an indigenous facultative anaerobic *Bacillus cereus* strain isolated from tannery effluent. *African Journal of Biotechnology*, 12(10).

Smith, W. L., & Gadd, G. M. (2000). Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 88(6), 983-991.

Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W., & Garg, S. K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*, 48(4), 427-435.

Stefanescu, I. A. (2015). Bioaccumulation of heavy metals by *Bacillus megaterium* from phosphogypsum waste. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 16(1), 93.

Sukumar, C., Janaki, V., Kamala-Kannan, S., & Shanthi, K. (2014). Biosorption of chromium (VI) using *Bacillus subtilis* SS-1 isolated from soil samples of electroplating industry. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 16(2), 405-413.

T

Thatheyus, A. J., & Ramya, D. (2016). Biosorption of chromium using bacteria: an overview. *Sci. Inter*, 4(7).

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

V

Vendruscolo, F., da Rocha Ferreira, G. L., & Antoniosi Filho, N. R. (2017). Biosorption of hexavalent chromium by microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 87-95.

Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., & Giovannetti, L. (2014). Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 633-659.

W

Wang, Y. T., & Shen, H. (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 14(2), 159-163.

X

Xiao, W., Ye, X., Yang, X., Zhu, Z., Sun, C., Zhang, Q., & Xu, P. (2017). Isolation and characterization of chromium (VI)-reducing *Bacillus sp.* FY1 and *Arthrobacter sp.* WZ2 and their bioremediation potential. *Bioremediation Journal*, 21(2), 100-108.

Xu, W. H., Jian, H., Liu, Y. G., Zeng, G. M., Li, X., & Zhang, W. (2015). Bioreduction of Chromate by an Isolated *Bacillus anthracis* Cr-4 with Soluble Cr (III) Product. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(3), 82.

Y

Yang, J., He, M., & Wang, G. (2009). Removal of toxic chromate using free and immobilized Cr (VI)-reducing bacterial cells of *Intrasporangium* sp. Q5-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1579-1587.

Yeung, A. T. (2006). Contaminant extractability by electrokinetics. *Environmental Engineering Science*, 23(1), 202-224.

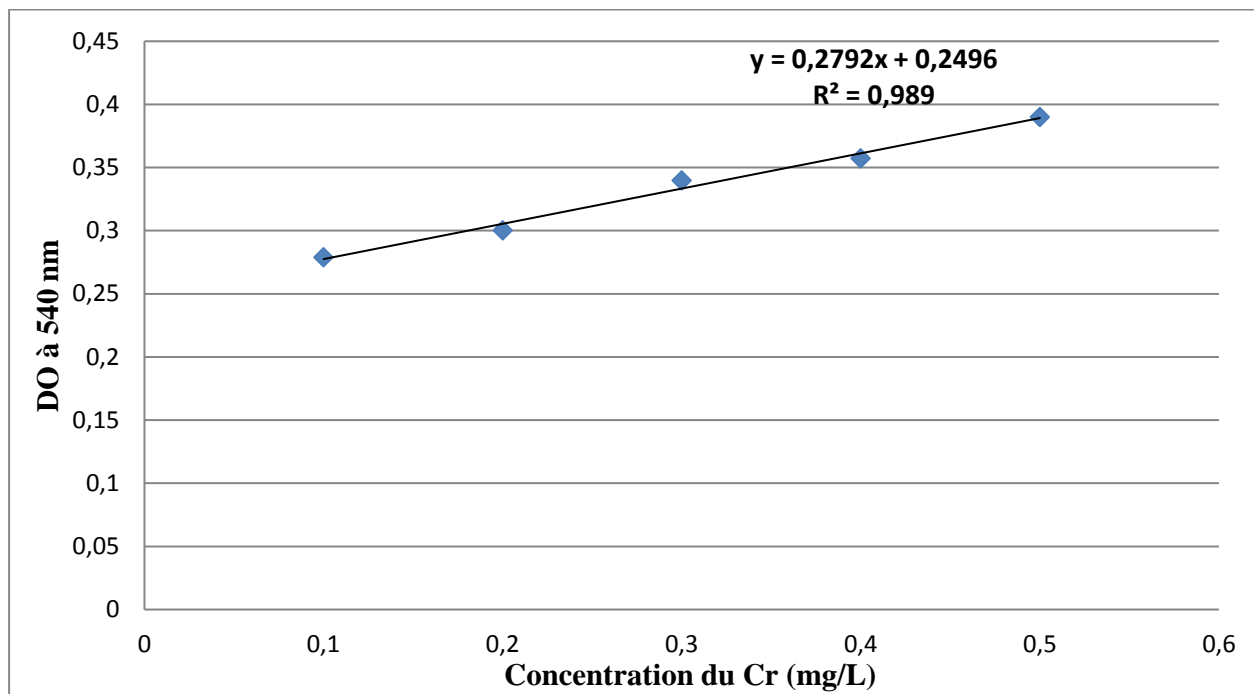
Z

Zayed, A. M., & Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil*, 249(1), 139-156.

Zhao, C., Yang, Q., Chen, W., & Teng, B. (2011). Removal of hexavalent chromium in tannery wastewater by *Bacillus cereus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(1), 23-28.

Pour préparer les solutions mères à 1000 mg/l, la masse de chaque métal est dissous dans 1L d'eau distillée.

Annexe 4: Courbe étalon du chrome du bouillon nutritif



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

Solution étalon n°	Concentration Cr (mg/L)	DO à 540 nm
1	0,0	0,000
2	0,1	0,2790
3	0,2	0,3003
4	0,3	0,3399
5	0,4	0,3575
6	0,5	0,3900

Annexe 5 : Les valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour la culture *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence du Chrome, Mercure et Plomb.

[Cr (VI)] mg/L	DO à t0	DO à t24
0	0,2191	0,8496
10	0,2348	0,5439
20	0,3030	0,5023
30	0,3600	0,4564
40	0,3268	0,4820
50	0,3957	0,4255
60	0,4429	0,4710
70	0,4833	0,4836
80	0,4503	0,4171
90	0,4667	0,3919
100	0,4805	0,4079

[Pb] mg/L	DO à t0	DO à t24
0	0,1917	0,7974
10	0,2409	0,7564
20	0,2557	0,8027
30	0,2601	0,8269
40	0,3242	0,7965
50	0,3450	0,9238
60	0,2623	0,7219
70	0,2932	0,8238
80	0,3161	0,8828
90	0,3574	0,9050
100	0,2981	0,6266

[Hg] mg/L	DO à t0	DO à t24
0	0,1743	0,6936
10	0,2400	0,2200
20	0,2001	0,1497
30	0,1835	0,1630
40	0,1669	0,1568
50	0,2089	0,1849
60	0,2125	0,1695
70	0,2241	0,1914
80	0,2198	0,1896
90	0,2138	0,1838
100	0,2117	0,1833

Annexe 6 : Les valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour le test de l'effet de la biomasse testée.

DO à 600 nm Temps (heure)	contrôle [A3-1]	5%	10%	12,50%
t0	0,1298	0,1108	0,1378	0,1576
t24h	1,8900	0,3435	0,3122	0,3046
t48h	1,7681	0,3745	0,2981	0,2918
t72h	2,7062	0,3487	0,3070	0,2894
t96h	2,7783	0,3611	0,9224	0,6736

Les valeurs de la DO diluée 1/10 mesurer à 540 nm pour le test de l'effet de la biomasse testée.

DO à 540 nm Temps (heure)	5%	10%	12,50%
t0	0,1999	0,1968	0,1929
t24h	0,1743	0,1693	0,1668
t48h	0,1664	0,1672	0,1644
t72h	0,1781	0,1739	0,1712
t96h	0,1949	1,5849	0,2277

Les valeurs de la concentration calculées pour l'effet de la biomasse.

% de la biomasse Temps (heure)	5%	10%	12,50%
t0	35,33	35,33	35,33
t24h	8,8612	4,262	2,027
t48h	2,657	0	0
t72h	0	0	0

Les valeurs taux de réduction du chrome (VI) pour l'effet de la biomasse.

Temps (heure)	5%	10%	12,50%
t0	0%	0%	0%
t24h	74,49%	87,93%	94,26
t48h	2,657	100%	100%
t72h	100%	100%	100%

Annexe 7: Les valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour le test de l'effet du le pH.

DO à 600 nm Temps (heure)	pH5	pH6	pH7	pH8
t0	0,1999	0,2182	0,202	0,2129
t24h	0,2169	0,3673	0,4201	0,3694
t48h	0,2249	0,2928	0,5237	2,8272
t72h	0,2341	0,3262	0,6461	3,0162

Les valeurs de la DO diluée 1/10 mesurer à 540 nm pour le test de l'effet du pH.

DO à 540 nm	pH5	pH6	pH7	pH8
Temps (heure)				
t0	0,1999	0,2182	0,202	0,2129
t24h	0,2169	0,3673	0,4201	0,3694
t48h	0,2249	0,2928	0,5237	2,8272
t72h	0,2341	0,3262	0,6461	3,0162

Les valeurs de la concentration pour l'effet du pH.

[Cr] en mg/L	pH5	pH6	pH7	pH8
Temps (heure)				
t0	26,55	26,86	27,95	29,39
t24h	18,91	17,48	12,92	7,74
t48h	17,47	15,66	7,48	0
t72h	10,54	9,77	2,86	0

Les valeurs taux de réduction du chrome (VI) pour l'effet du pH.

Temps (heure)	T0	T24h	T48h	T72h
PH5	0%	26,78%	34,2%	60,30
PH6	0%	34,92%	41,7%	63,62%
PH7	0%	53,77%	73,23%	100%
PH8	0%	73,66%	89,77%	100%

Annexe 8 : Les valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour le test de l'effet de l'agitation.

DO à 600 nm	Avec agitation	Sans agitation
Temps (heure)		
t0	0,1375	0,1415
t24h	0,5353	0,2187
t48h	0,5949	0,4079
t72h	1,7947	0,6072
T96h	2,8574	0,7162

Les valeurs de la DO dilue 1/10 mesurer à 540 nm pour le test de l'effet de l'agitation.

DO à 540 nm	Avec agitation	Sans agitation
Temps (heure)		
t0	0,7428	0,7428
t48h	0,4484	0,4934
t72h	0,25	0,3681
T96h	0,2357	0,2839

Les valeurs de la concentration calculée pour l'effet de l'agitation.

[Cr] en mg/L	Avec agitation	Sans agitation
Temps (heure)		
t0	35,33	35,33
t48h	7,1203	8,732
t72h	0,001	4,24
T96h	0	1,22

Les valeurs taux de réduction du chrome (VI) pour l'effet d'agitation.

Temps (heure)	Avec agitation	Sans agitation
t0	0%	0%
t48h	79,85%	75,28%
t72h	99,99%	88%
T96h	100%	96,55%

Annexe 9 : Les valeurs du poids sec en mg de biomasse/ 5ml de volume.

Poids sec (mg/5ml)	(A3-1)	(A3-1) + Cr
Temps (heure)		
t24h	2,2	0,7
t48h	6,1	2,5
t72h	12,4	5,4

Les valeurs du poids sec en mg de biomasse/unité de volume.

Poids sec (mg/L)	(A3-1)	(A3-1) + Cr
Temps (heure)		
t24h	0,44	0,14
t48h	1,22	0,5
t72h	2,48	1,08

Annexe 10 : Les valeurs de la DO mesurée à 540 nm pour le test la bioaccumulation.

DO à 54 nm	(A3-1)	(A3-1) + Cr
Temps (heure)		
t24h	0,277	0,260
t48h	0,320	0,292
t72h	0,377	0,259

Les valeurs Les valeurs de la concentration calculée pour le test de bioaccumulation.

[Cr] en mg/L	(A3-1)	(A3-1) + Cr
Temps (heure)		
t24h	0,1	0,04
t48h	0,253	0,152
t72h	0,458	0,352

Présenté par : Selma Hafsaoui Dounia Rouibah	Présidente : M^{me} Samya Amira Examineur : M^{me} Ghania Bourzama Encadreur : Dr. Houria OuledHaddar
---	--

**Evaluation de l'effet de quelques paramètres sur l'élimination du chrome hexavalent par
*Bacillus megaterium***

Résumé

Au cours des dernières années, la pollution par les métaux lourds est devenue l'un des problèmes environnementaux les plus graves. Le chrome est l'un des métaux les plus employés en industrie, dont le chrome hexavalent est considéré parmi les polluants les plus toxiques à cause de ses propriétés cancérogènes.

L'objectif de ce travail est concerné l'étude expérimentale de la résistance au chrome (VI) par la souche *Bacillus megaterium* (A3-1) isolée à partir des effluents de la tannerie, en déterminant la CMI d'une part, et d'autre part en mettant en évidence l'importance de certains paramètres expérimentaux, notamment le pH, l'agitation et la densité de la biomasse, ainsi que d'étudier le mécanisme d'élimination du chrome.

Les résultats obtenus montrent que *Bacillus megaterium* tolérait jusqu' à 70 mg/ml de Cr (VI) et possédait un pouvoir réducteur de 100% après 72h d'incubation dans les conditions favorables de pH, de la température et d'aération, avec une concentration initiale en Cr (VI) de 30 mg/ml. La souche (A3-1) est capable de réduire le Cr (VI) par adsorption.

Mots clés : *Bacillus megaterium*, chrome hexavalent, réduction du Cr (VI).

Abstract

In recent years, heavy metals pollution becomes one of the most serious environmental problems. Chromium is one of the most widely used metals in industry, of which hexavalent chromium is considered among the most toxic pollutants because of its carcinogenic properties.

The aim of this work was to carry out an experimental study on the resistance of *Bacillus megaterium* (A3-1) isolated from the tannery effluents to chromium (VI), by determining the MIC on the one hand. On the other hand, by demonstrating the importance of certain experimental parameters, in particular pH, agitation and biomass density. As well as to study the chromium removal mechanism.

The results obtained showed that *Bacillus megaterium* tolerated up to 70 mg / ml of Cr (VI) and displayed a reducing capacity of 100% after 72 hours of incubation at favorable conditions of pH, temperature and aeration, with an initial Cr (VI) concentration of 30 mg /ml. The strain (A3-1) is capable of reducing Cr (VI) by adsorption.

Keywords: *Bacillus megaterium*, hexavalent chromium, reduction of Cr (VI).

ملخص

في السنوات الأخيرة أصبح التلوث أكبر خطر مهدد للبيئة و هذا راجع إلى تراكم عدة ملوثات من بينها المعادن الثقيلة. يعتبر الكروم واحدا من أكثر المعادن استخداما في الصناعة، حيث أن الكروم السداسي التكافؤ يعد من أكثر الملوثات السامة بسبب خواصه المسرطنة. الهدف من هذا العمل هو تحقيق دراسة تجريبية حول مقاومة السلالة (*Bacillus megaterium* (A3-1) المعزولة من أحوال المديغة للكروم (VI) ، من خلال تحديد التركيز الأدنى المثبت من جهة، و من جهة أخرى تسليط الضوء على أهمية بعض العوامل التجريبية خاصة درجة الحموضة، الرج و كثافة الكتلة الحيوية فضلا عن تحديد الآلية المستخدمة في القضاء على الكروم. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن *Bacillus megaterium* تستطيع تحمل حوالي 70 مغ/ل من الكروم (VI) و قوة إرجاع تقدر ب 100% بعد 72 ساعة من الحضان، مع توفير الظروف الملائمة من درجة الحموضة، درجة الحرارة و التهوية، في وجود 30مغ/ل كتركيز أولي من الكروم. كما أظهرت السلالة قدرتها على إرجاع الكروم عن طريق الامتزاز.

كلمات مفتاحية: *Bacillus megaterium*، الكروميوم السداسي التكافؤ، إرجاع الكروم (VI).

INTRODUCTION

CONCLUSION

ÉTUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

*RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES*

*MATÉRIEL ET
MÉTODES*

*RÉSULTATS ET
DISCUSSION*

ANNEXES
