

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 جيجل  
Université de Jijel

M.M.B.01/14



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

**Etude de la Bioaccumulation de Chrome et de Plomb par  
Quelques Bactéries d'Origines Différentes**

### Membres de Jury

Président : Mr. Laib Essaid  
Examinatrice : M<sup>elle</sup>. Amira Samiya  
Encadreur : Dr. Ouled Haddar Houria

### Présenté par:

Fenek Warda  
Mimoune Ahlem



Année Universitaire 2013-2014

Numéro d'ordre (bibliothèque) : .....

---

## SOMMAIRE

Sommaire.....	I
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Liste des abréviations.....	V
Introduction.....	1
Chapitre I: Métaux lourds et pollution	
I. Les métaux lourds dans l'environnement .....	2
II. Origine des métaux lourds .....	2
II.1. L'origine naturelle.....	2
II.2. L'origine anthropique.....	2
III. Toxicité des métaux lourds.....	3
III.1. L'effet des métaux lourds sur l'environnement .....	3
III.1.1. Métaux lourds dans l'eau.....	4
III.1.2. Métaux lourds dans le sol.....	4
III.2. Effet des métaux lourds sur l'Homme .....	4
III.3. Effet des métaux lourds sur les microorganismes .....	6
Chapitre II : Elimination des métaux lourds	
I. L'élimination des métaux lourds à partir de l'environnement.....	8
II. Les techniques de dépollution de l'environnement.....	8
III. Les interactions entre les bactéries et les métaux lourds .....	9
IV. Définition de la bioaccumulation .....	10
IV.1. La biosorption (passive uptake) .....	10
IV.2. L'accumulation intracellulaire (active uptake) .....	10
V. Bioaccumulation de quelques métaux lourds par les bactéries .....	11
V.1. Bioaccumulation du plomb .....	11
V.2. Bioaccumulation de chrome .....	11
V.3. Bioaccumulation du cadmium .....	11
V.4. Bioaccumulation du zinc .....	12
VI. L'élimination des métaux lourds à partir du corps humain .....	12

---

## Matériel et Méthodes

I. Matériel .....	14
I.1. Les souches bactériennes: .....	14
I.2. Les milieux de culture .....	15
I.3. Appareillage .....	15
I.4. Produits chimiques et réactifs .....	15
II. Méthodes .....	17
II.1. Revivification des souches .....	17
II.2. Préparation des solutions mères de métaux lourds .....	17
II.3. sélection des souches résistantes aux métaux lourds .....	17
II.4. Réalisation d'une courbe d'étalonnage pour la quantification des cellules par spectrophotométrie.....	17
II.5. Calcul du taux de croissance.....	18
II.6. Caractéristiques biochimiques et morphologiques des souches sélectionnées .....	18
II.7. Effet des métaux lourds sur la croissance des souches .....	19
II.7.1. Préparation de l'inoculum .....	19
II.7.2. Suivi de la croissance avec et sans métaux lourds .....	19
II.8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	19
II.9. Bioaccumulation de Cr et Pb par les souches bactériennes.....	20
II.9 .1. Bioaccumulation de Chrome.....	20
II.9 .2. Bioaccumulation du Plomb .....	20
II.9.3. Lyse des cellules .....	21
Résultats et discussion	
I. Criblage des souches résistantes au métal .....	22
II. Identification partielle des isolats sélectionnés .....	24
III. effet des métaux lourd sur la croissance des souches sélectionné .....	26
VI. La concentration minimale inhibitrice .....	28
V. Teste de la bioaccumulation du métal .....	28
Conclusion .....	31
Références.....	32
Annexes	

---

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> la répartition des métaux lourds dans le corps humain.....	5
<b>Figure 2:</b> Schéma des interactions entre métaux et bactéries.....	9
<b>Figure 3:</b> Cinétique de croissance des 5 souches bactériennes de l'environnement dans le bouillon nutritif additionné du métal (Chrome) (40 mg/ l) à 37° C.....	22
<b>Figure 4:</b> Cinétique de croissance des 5 souches bactériennes de l'environnement dans le bouillon nutritif additionné du métal (Pb) 100 ppm à 37° C.....	22
<b>Figure 5:</b> Cinétique de croissance des 5 souches bactériennes lactiques dans le bouillon MRS additionné du métal (Chrome) (40 mg/ l) à 37° C.....	23
<b>Figure 6:</b> Cinétique de croissance des 5 souches bactériennes lactiques dans le bouillon MRS additionné du métal (Pb) 100 ppm à 37° C.....	23
<b>Figure 7:</b> Cinétique de croissance de la souche sélectionnée (E1) dans le bouillon nutritif en présence et en absence du métal (Pb) 100 ppm à 37° C.....	26
<b>Figure 8:</b> Cinétique de croissance de la souche sélectionnée (E4) dans le bouillon nutritif en présence et en absence du métal (Cr) 40 mg/l à 37° C.....	26
<b>Figure 9:</b> Cinétique de croissance de la souche sélectionnée (L1) dans le bouillon MRS en présence et en absence du métal (Cr) 40 mg/l à 37° C.....	26
<b>Figure 10:</b> Cinétique de croissance de la souche sélectionnée (L5) dans le bouillon MRS en présence et en absence du métal (Pb) 100 ppm à 37° C.....	26
<b>Figure 11 :</b> bioaccumulation du chrome par la souche (E4).....	29
<b>Figure 12 :</b> bioaccumulation du chrome par la souche (Stsa).....	29
<b>Figure 13 :</b> bioaccumulation du plomb par la souche (E1).....	29
<b>Figure 14 :</b> bioaccumulation du plomb par la souche (15).....	29

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Les sources anthropiques des métaux lourds spécifiques dans l'environnement.....	3
<b>Tableau 2:</b> Origine des souches utilisées.....	14
<b>Tableau 3:</b> Le taux de croissance des dix souches bactériennes dans le milieu contenant le métal.....	24
<b>Tableau 4:</b> Les Caractères biochimiques et morphologiques des souches sélectionnées.....	25
<b>Tableau 5 :</b> le taux de croissance des 4 souches sélectionnées avec et sans métaux.....	27

DO	Densité Optique
EPS	Exo polysaccharides
Fe	Fer
GN	Gélose Nutritive
Hg	Mercurie
H <sub>2</sub> S	Sulfure d'hydrogène
LDC	lysine décarboxylase
Mn	Manganèse
Methylg	Méthyle mercure
Me <sup>n+</sup>	Cation Métallique
Mg	Magnésium
MRS	Man, Rogosa et Sharpe
MEVAG	Milieu d'Etude de la Voie d'Analyse des Glucides
min	minute
Ni	Nickel
OMS	Organisation Mondiale De La Santé
ODC	Ornithine décarboxylase
Org	un composé organique
Pb	Plomb
ppm	Partie Par Million
RM	Rouge de Méthyle
SM	Solution Mère.
SAA	Spectrométrie d'Absorption Atomique
S	Groupe Réactifs Présents Sur La Paroi Bactérienne.
TSI	Triple Sugar Iron
VP	Voges Proskauer
Zn	Zinc

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADH	Arginine Dihydrolase
AAF	Aérobie Anaérobie Facultatif
As	Arsenic
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
BL	Bactéries Lactiques
BN	bouillon nutritive
Cd	Cadmium
CMI	Concentration Minimale d'Inhibition
Cr	Chrome
Cr (VI)	Chrome Hexavalent
Cu	Cuivre
DO	Densité Optique
EPS	Exo polysaccharides.
Fe	Fer
GN	Gélose Nutritive
Hg	Mercure
H <sub>2</sub> S	Sulfure d'hydrogène
LDC	lysine décarboxylase
Mn	Manganèse
MeHg	Méthyle mercure
Me <sup>2+</sup>	Cation Métallique
Mg	Magnesium
MRS	Man, Rogosa et Sharpe
MEVAG	Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides
min	minute
Ni	Nickel
OMS	Organisation Mondiale De La Santé
ODC	Ornithine décarboxylase
Org	un composé organique.
Pb	Plomb
ppm	Partie Par Million
RM	Rouge de Méthyle
SM	Solution Mère.
SAA	Spectrométrie d'Absorption Atomique
S	Groupements Réactifs Présents Sur La Paroi Bactérienne.
TSI	Triple Sugar Iron
VP	Voges Proskauer
Zn	Zinc

Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le secteur industriel s'est développé sans préoccupation des rejets d'éléments toxiques dans l'environnement. De fait, l'environnement a été longtemps considéré comme une ressource renouvelable, voire même inépuisable à l'échelle des générations humaines, capable de recevoir sans conséquence les rejets de nos activités. A été, ce patrimoine est menacé à la fois par le lourd héritage du passé et par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel (**Martin et Ruby, 2004; Guiné et al., 2006**).

Le problème de la pollution de métaux lourds est de plus en plus et plus grave avec l'augmentation de l'industrialisation et de la perturbation des cycles biogéochimiques naturels. Contrairement à des substances organiques, les métaux lourds sont essentiellement non biodégradables et s'accumulent donc dans l'environnement. L'accumulation de métaux lourds dans les sols et les eaux pose un risque pour la santé humaine et l'environnement. Ces éléments s'accumulent dans les tissus des organismes vivants (bioaccumulation) et leurs concentrations augmentent lors de leur passage de niveaux trophiques inférieurs aux niveaux trophiques supérieurs (**Hazrat et al., 2013**). Ainsi, pour reprendre les termes d'un récent rapport de l'Office Parlementaire des Choix Scientifiques et Technologiques, « si les métaux lourds ont fait la civilisation, ils peuvent aussi la défaire ». Il est donc aujourd'hui indispensable non seulement de mieux connaître les effets de ces polluants sur les organismes vivants, mais aussi de mettre en œuvre des solutions durables, visant à limiter leurs risques. Malgré leur forte toxicité potentielle, la plupart des sites contaminés par des métaux lourds, présentent souvent une flore diversifiée tolérant apparemment bien de fortes teneurs en métaux (**Martin et al., 1996**).

Les microorganismes, en particulier les bactéries, peuvent interagir avec les métaux de différentes manières. On peut tout d'abord observer une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Ces modifications modifient généralement la toxicité et la mobilité du métal d'origine. Les métaux peuvent également être accumulés par des phénomènes d'adsorption passive au niveau des membranes ou par transport actif à l'intérieur de la cellule (**Bhaskar et Bhosle, 2006; Pal et Paul, 2008**).

Le but principal de notre travail est d'étudier le processus de la bioaccumulation de plomb et de chrome par quelques types de bactéries. Des métaux toxiques sans fonction biologique connue qui sont accumulés par deux types de souches bactériennes isolées précédemment à partir de la boue activée (effluent de la tannerie de Jijel) en plus de quelques bactéries lactique. En plus l'identification des souches dominantes impliquée dans ce processus.

## **I. Les métaux lourds dans l'environnement :**

L'activité industrielle toujours croissante est la source principale de la plupart des problèmes de pollution environnementale et des dommages d'écosystèmes, notamment l'accumulation des métaux lourds toxiques (chrome, cuivre, plomb, cadmium, zinc, nickel, etc.). Ce sont des composés stables, hautement persistants et des contaminants de l'environnement; qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs à travers les chaînes trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (**Regine et al., 2000**).

La plupart des sels de métaux lourds sont solubles dans l'eau, et par conséquent ne peuvent pas être éliminés par des moyens physiques classiques de séparation. Les méthodes physico-chimiques ont été largement utilisées pour éliminer les ions de métaux lourds à partir des sites pollués. Ces processus peuvent être inefficaces ou coûteux (**Volesky, 1990**). Par contre les méthodes biologiques telles que la biosorption/bioaccumulation peuvent fournir une alternative intéressante aux méthodes physico-chimiques. En 1990, les premiers travaux ont décrit comment des matériaux biologiques abondants pourraient être utilisés pour éliminer et récupérer, à très faible coût, même de petites quantités de métaux lourds toxiques des effluents industriels (**Hany, 2004**).

D'un point de vue purement scientifique et technique, les métaux lourds peuvent être définis comme: tout métal ayant une densité supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$ , tout métal pouvant être toxique pour les systèmes biologiques (**Gadd, 1992; Nies, 1999 ; Gutiérrez et al., 2003** ).

## **II. Origine des métaux lourds :**

Les métaux lourds proviennent de différentes sources notamment :

### **II.1. L'origine naturelle :**

Ces métaux lourds sont présents de façon naturelle dans le sol et sont majoritairement le résultat d'une altération de la roche mère du sous-sol. Toutefois, les différentes activités humaines contribuent également à augmenter leur quantité (**Bourrelier et Berthelin, 2008**).

### **II.2. L'origine anthropique :**

Les teneurs les plus élevées en éléments inorganiques rencontrées dans les sols sont fortement liées à l'activité humaine, voire les pratiques agricoles dues aux épandages d'insecticides, de fongicides, d'engrais, de boues résiduaires urbaines ou de composts d'ordures ménagères, aussi bien que la pollution due aux retombées atmosphériques telles que l'industrie extractive et métallurgique, les pratiques liées à l'incinération, l'utilisation des énergies fossiles, l'essence au plomb, et enfin le stockage de déchets urbains ou industriels. Le **tableau 1** résume quelques sources de métaux lourds (**Wuana et Okieimen, 2011 ; Hazrat et al., 2013**).



**Tableau 1 :** Les sources anthropiques des métaux lourds spécifiques dans l'environnement (Hazrat et al., 2013).

Métaux Lourds	Sources
Cd	Peintures et pigments, les engrais phosphatés.
Hg	Les tanneries, les industries métalliques.
Cr	Les pesticides, les engrais.
Cu	Sortie de la combustion du charbon, les déchets médicaux.
Ni	Les effluents industriels, instruments chirurgicaux, les batteries d'automobiles.
Pb	Les émissions aériennes de la combustion de l'essence au plomb, des herbicides et des insecticides.

### III. Toxicité des métaux lourds :

Parmi les éléments chimiques minéraux, les métaux occupent une place prépondérante dans notre monde moderne, car ils interviennent dans la plupart des secteurs d'activité. Par ailleurs, ils sont, pour beaucoup d'entre eux, indispensables au monde vivant (fer, zinc...) parfois en très faible quantité (oligo-éléments essentiels). Certains de ces oligo-éléments (chrome, nickel, manganèse...) indispensables à petite dose, deviennent toxiques à forte concentration. Enfin, il y a des métaux comme le mercure, le plomb et le cadmium qui sont toxiques pour l'Homme, les plantes, les animaux et un grand nombre de microorganismes (Coral et al., 2005).

#### III.1. L'effet des métaux lourds sur l'environnement :

La présence des métaux lourds toxiques dans l'air, le sol et l'eau est reconnue comme une source de menace croissante pour l'environnement et la santé humaine. Des centaines de sources de pollution par les métaux lourds, y compris les industries du charbon, du gaz naturel et du papier. Les principales menaces pour la santé humaine de métaux lourds sont associées à l'exposition au Pb, Cd, Hg et l'As. Ces métaux ont été largement étudiés et leurs effets sur la santé humaine sont revus régulièrement par des organisations internationales telles que l'OMS. Indépendamment de la toxicité, les métaux lourds ont de long temps de séjour, et ont de longues demi-vies biologiques; en particulier le cadmium, qui constitue un problème majeur dans les pays industrialisés, puisque sa présence dans l'environnement met en péril la santé publique. D'autre part, l'introduction des métaux lourds, sous diverses formes dans l'environnement, peut produire des modifications considérables dans les communautés microbiennes et leurs activités (Nithya et al., 2011).

**III.1.1. Métaux lourds dans l'eau :**

L'augmentation de la concentration des polluants dans les estuaires et les océans, en particulier celle des métaux lourds, est à l'origine de nombreuses études dans différentes zones du globe. En effet, les industries situées à proximité des cours d'eau rejettent souvent leurs effluents dans ceux-ci en plus de l'érosion et le ruissellement de l'eau. L'eau transporte les métaux lourds et les insère dans les chaînes alimentaires. Même si les métaux lourds sont le plus souvent présents à l'état de traces, leur toxicité se développe par bioaccumulation dans les tissus vivants (**Kaimoussi et al., 2005**).

**III.1.2. Métaux lourds dans le sol :**

La contamination par des métaux lourds dans les sols est l'un des principaux problèmes environnementaux dans le monde qui présente des risques significatifs pour la santé publique et les écosystèmes (**Sheng et al., 2008**). Ces éléments toxiques sont considérés comme des polluants du sol en raison de leur présence répandue, et leurs effets toxiques aigus et chroniques sur les plantes cultivées de ces sols. La limite réglementaire du cadmium(Cd) dans les sols agricoles est de 100 mg/kg. Mais ce seuil est dépassé en permanence en raison de plusieurs activités humaines. Les plantes exposées à des niveaux élevés de cadmium montrent une réduction de la photosynthèse, de l'absorption d'eau, et de l'absorption de nutriments. Les plantes cultivées dans un sol contenant des niveaux élevés de cadmium présentent des symptômes visibles de blessures réfléchies en termes de chlorose, inhibition de la croissance, le brunissement des racines, et finalement la mort (**Yadav, 2010**).

**III.2. Effet des métaux lourds sur l'Homme :**

Pour l'Homme, la problématique des métaux lourds est majeure car elle affecte toutes les caractéristiques de la vie (**Sisca et al., 2009**). La toxicité d'un métal peut être influencée par un certain nombre de facteurs. La **figure 1** illustre la répartition des métaux dans le corps humain. Parmi ces facteurs, on trouve ceux qui sont liés au contaminant (ou facteurs extrinsèques) tel que la nature du métal, spéciation chimique, organotropisme, biodisponibilité, etc..., ces métaux peuvent agir en se liant à divers ligands contenant des groupements thiols ce qui peut conduire au blocage des groupes fonctionnels des molécules importantes telle, que les enzymes, les polynucléotides, ils peuvent entraîner en outre la substitution des métaux essentiels. A ces facteurs, ils y'a d'autres facteurs intrinsèques liés à l'âge, le sexe, l'état nutritionnel, les conditions d'expositions et la variabilité génétique, etc... L'ensemble de ces facteurs peut influencer sur la charge corporelle d'un métal, sa distribution tissulaire et ses effets nocifs (**Kakkar et al., 2005**).

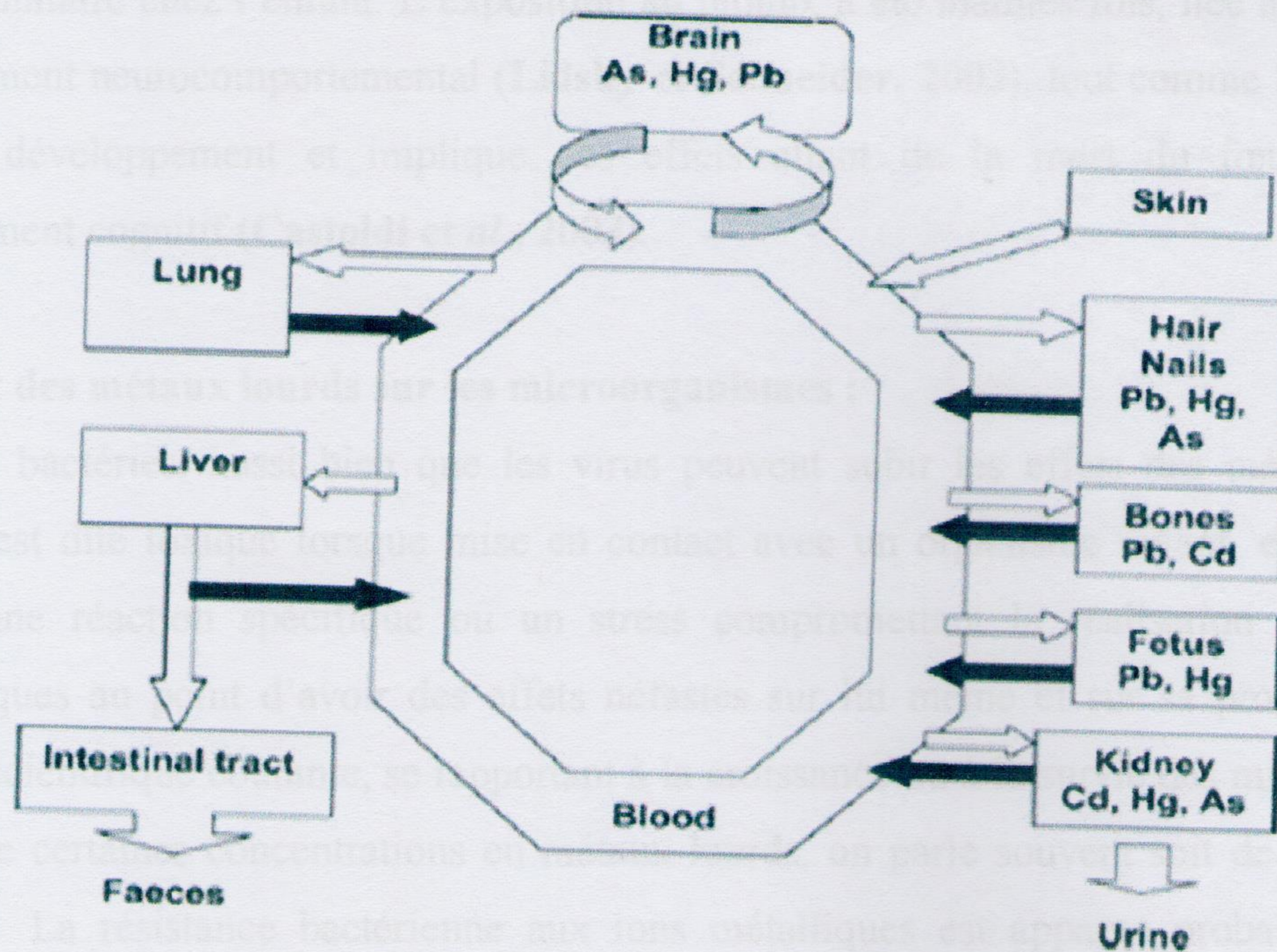


Figure 1 : la répartition des métaux lourds dans le corps humain (Kakkar *et al.*, 2005).

La toxicité des métaux varie aussi selon la dose et la durée d'exposition. Une exposition de courte durée à des concentrations élevées cause des syndromes aigus, alors que l'exposition de longues durées à de faibles concentrations provoque des troubles chroniques. La gastroentérite, la pneumonie et l'insuffisance rénale et hépatique sont les troubles les plus fréquemment observés en cas d'exposition de longue durée à un certain nombre de métaux (cadmium, cuivre, plomb, zinc). L'exposition à des métaux pourrait également causer le cancer (Kakkar *et al.*, 2005).

Les métaux lourds peuvent entraîner chez l'Homme des pathologies touchant à son intégrité physique et mentale. Il n'est alors plus capable de réagir et de s'adapter aux diverses situations. Les métaux lourds peuvent s'accumuler au sein de l'organisme et donc perturber son organisation interne. Certains d'entre eux ont des effets tératogènes et d'autres peuvent entraîner des troubles de la fécondité. Par conséquent, chaque fonction fondamentale et vitale de l'Homme est mise en danger par la présence des métaux lourds dans son environnement (Sisca *et al.*, 2009).

#### Exemples :

Le cadmium, le plomb et le mercure sous sa forme organique (méthylmercure, MeHg), sont les polluants particulièrement visés, à cause de leur large distribution et leurs implications profondes dans la santé humaine (Clarkson et Magos, 2006; Islam *et al.*, 2007; Mergler *et al.*, 2007).

L'intoxication au cadmium, chez la femme enceinte, a été liée à la diminution de la durée de la grossesse, du poids du nouveau-né et, récemment, au dysfonctionnement du système endocrinien

et/ou immunitaire chez l'enfant. L'exposition au plomb, a été maintes fois, liée à un retard dans le développement neurocomportemental (**Lidsky et Schneider, 2003**), tout comme le MeHg, qui nuit au neuro développement et implique des effets allant de la mort du fœtus au retard du développement cognitif (**Castoldi et al., 2003**).

### **III.3. Effet des métaux lourds sur les microorganismes :**

Les bactéries, aussi bien que les virus peuvent subir les effets des métaux lourds. Une substance est dite toxique lorsque mise en contact avec un organisme vivant, elle peut entraîner chez lui une réaction spécifique ou un stress compromettant la réalisation de ses fonctions physiologiques au point d'avoir des effets néfastes sur lui même et sur sa progéniture. Dans la littérature scientifique courante, se rapportant à la croissance ou à la survie des microorganismes en présence de certaines concentrations en métaux lourds, on parle souvent soit de tolérance soit de résistance. La résistance bactérienne aux ions métalliques est apparue probablement tôt dans l'évolution due à la dispersion des métaux par un événement géologique (**Bruins et al., 2000; Wright et Welbourn, 2002 ; Hobman et al., 2007** ).

Les métaux qui n'ont pas de fonction biologique sont généralement tolérés à faibles concentrations, alors que les métaux essentiels sont acceptés à plus forte concentration (**Bruins et al., 2000**). Ces derniers participent au fonctionnement métabolique des cellules en tant que constituants d'enzymes ou constituants structurels (exemple de la membrane). La concentration et la spéciation du métal déterminent si celui-ci est utile ou nocif à la cellule. Le contrôle des concentrations internes, ou homéostasie, s'avère donc nécessaire. C'est pourquoi les bactéries ont développé différentes stratégies de défense pour se protéger de la toxicité des métaux : De nombreuses bactéries sont désormais connues pour leur capacité à excréter les métaux par des systèmes d'efflux. Ces types de transporteurs se caractérisent par une forte affinité au substrat et permettent de maintenir de faibles concentrations métalliques dans le cytosol (**Mergeay et al., 1987; Nies, 2003**). Si les métaux toxiques sont entrés dans la cellule et ne peuvent pas être excrétés par des systèmes d'efflux, plusieurs organismes ont développé des mécanismes de séquestration cytosolique pour se protéger. Il a été montré chez beaucoup d'organismes résistants aux métaux que des composés internes comme, par exemple, des granules de polyphosphates ou des groupements thiols (contenant du soufre), étaient capables de séquestrer des grandes quantités de cations métalliques (**Gadd et Smith 2000; Pagès et al., 2007**). La bioaccumulation de métaux lourds et leur stockage subséquent dans la cellule sous forme inerte permettent à la cellule de diminuer leur toxicité (**Sarret et al., 2005**). Malgré la présence d'ions toxiques, certains microorganismes sont capables de survivre dans des milieux pollués. Cette capacité peut être le résultat de mécanismes

induits ou intrinsèques aux individus (Gadd, 1992). Pour les microorganismes, Gadd (1992) définit la tolérance comme la capacité de faire face à la toxicité des métaux au moyen des propriétés intrinsèques des organismes. En parallèle, il décrit la résistance comme la capacité à survivre aux métaux toxiques par des mécanismes de détoxification en réponse directe à la présence de métaux dans l'environnement.

*Chapitre II : Élimination  
des métaux lourds*

**I. L'élimination des métaux lourds à partir de l'environnement :**

Les métaux lourds dans l'environnement sont non biodégradables, on parle de persistance des métaux. Ils ne sont susceptibles que de changer la forme chimique, et ont tendance à s'accumuler dans les organismes tout au long de la chaîne trophique, entraînant un risque important pour les écosystèmes et la santé humaine. L'exposition aux métaux lourds prend en effet deux formes : l'inhalation de particules, et l'ingestion directe (de poussières) ou par l'intermédiaire d'aliments contaminés. Pour ces raisons, il est essentiel de disposer des techniques pour la diminution des métaux lourds dans l'environnement (**Choudhary et Sar, 2009; Zakhama et al., 2011**).

**II. Les techniques de dépollution de l'environnement :**

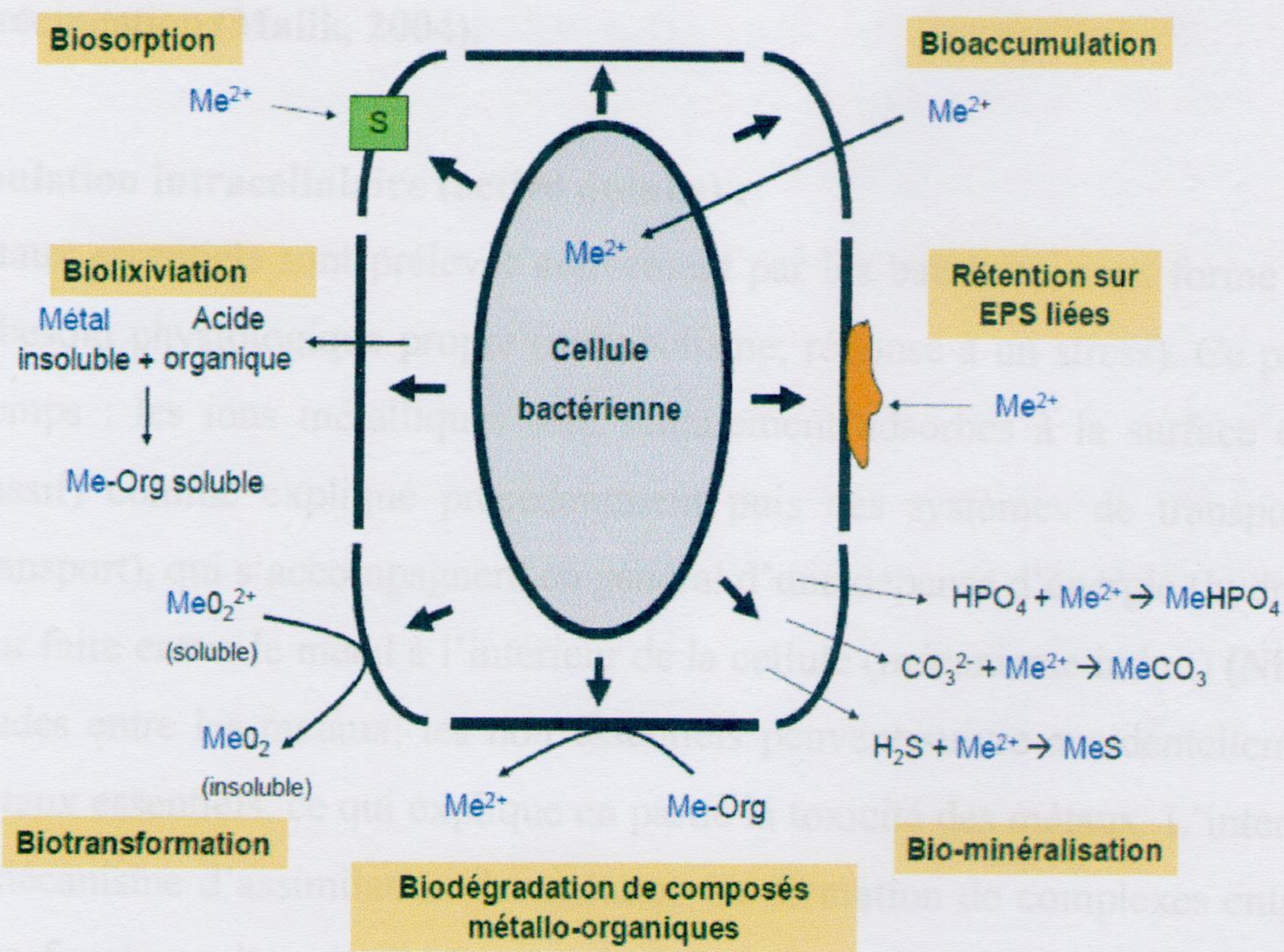
La dépollution est une approche très complexe, en revanche plusieurs techniques ont été mises en œuvre. Chaque technique dispose d'avantages et d'inconvénients en termes de temps, de coût, de préparation du milieu polluée, de transport, d'effets secondaires, etc. Chaque site est unique et une étude au cas par cas s'impose pour déterminer la meilleure combinaison de ces méthodes en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques, biologiques et hydrogéologiques du site à dépolluée (**Fornarini et al., 2005**).

Les techniques traditionnelles pour l'élimination des métaux lourds tels que la précipitation chimique, le traitement électrochimique, les procédés membranaires et l'échange d'ions sont extrêmement coûteuses ou inefficaces, en particulier pour les grands volumes de solution à des concentrations relativement très faibles de métaux lourds. Au cours des dernières années, une grande attention a été accordée à la bioremédiation des écosystèmes à partir de métaux lourds (**Teemu et al., 2008; Zakhama et al., 2011 et Boularab, 2011**).

La bioremédiation est une technique biologique basée sur l'utilisation des microorganismes comme biosorbants ou accumulant des métaux. Elle offre une alternative potentielle aux méthodes existantes pour la désintoxication et la récupération des métaux toxiques (**Fisher et Frood, 1980**). Cette technique peut être définie comme un processus qui utilise des micro-organismes, champignons, plantes vertes ou de leurs enzymes pour faire retourner le milieu naturel altérée par des contaminants à son état original (**Volesky, 1986**). C'est une méthode qui relativement efficace et la moins coûteuse pour le traitement des sites contaminés par les métaux lourds. Certains rapport sont montré que les microbes indigènes et les symbiotes plantes-microorganismes tolèrent des concentrations élevées de métaux lourds dans différentes manières (**Carrasco et al., 2005 ; Wei et al., 2009**).

**III. Les interactions entre les bactéries et les métaux lourds :**

Les microorganismes, en particulier les bactéries, peuvent interagir avec les métaux via différents mécanismes (Ledin, 2000). On peut observer une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Ces modifications modifient généralement la toxicité et la mobilité du métal d'origine. Les métaux peuvent également être accumulés par des phénomènes d'adsorption passive (indépendante du métabolisme) ou par transport actif à l'intérieur de la cellule (dépendante du métabolisme). La production de substances chélatrices des métaux telles que des composés organiques ou des sulfides en été également observée. De plus, de par leur participation aux cycles biogéochimiques, les microorganismes modifient les caractéristiques de la matière organique dans leur environnement, ce qui peut modifier le comportement des métaux via des mécanismes de chélation ou complexation (Haferburg et Kothe, 2007). Enfin les bactéries peuvent influencer de manière indirecte la mobilité des métaux par des modifications du milieu, par exemple par acidification. Ces différents mécanismes sont résumés dans la Figure 2.



**Figure 2:** Schéma des interactions entre métaux et bactéries (Ledin, 2000).

S : groupements réactifs présents sur la paroi bactérienne.  $Me^{2+}$  : un cation métallique. Org : un composé organique. EPS : Exo-polysaccharides.

Les interactions entre les cellules bactériennes et les métaux sont gouvernées par des mécanismes passifs ou actifs, ces deux modes d'interaction sont plus généralement regroupés sous le terme de bioaccumulation (**Chang, 1997; Haferburg et Kothe, 2007**).

#### **IV. Définition de la bioaccumulation :**

La bioaccumulation est un phénomène par lequel une substance, présente dans l'environnement, pénètre dans un organisme même si elle n'a aucun rôle métabolique, voire même si elle est toxique pour ce dernier (**Ramade, 1992**). L'accumulation traduit un état d'équilibre dynamique entre les processus d'absorption, de stockage et d'excrétion et permet d'indiquer le niveau de contamination d'un milieu (**Rainbow et Dallinger, 1993**).

##### **IV.1. La biosorption (passive uptake) :**

La biosorption est un processus indépendant du métabolisme et donc de l'état physiologique des cellules (vivantes ou mortes), elle est rapide et réversible. Elle a lieu à l'interface cellule/solution et met en jeu des mécanismes tels que l'échange ionique, la complexation de surface ou la précipitation (**Malik, 2004**).

##### **IV.2. L'accumulation intracellulaire (active uptake) :**

Les métaux essentiels sont prélevés activement par les bactéries, sous forme ionique, pour répondre à un besoin physiologique propre (métabolisme, réponse à un stress). Ce prélèvement se fait en deux temps : les ions métalliques sont initialement adsorbés à la surface extracellulaire (mécanisme passif) comme expliqué précédemment puis des systèmes de transport spécialisés (protéines de transport), qui s'accompagnent en général d'une dépense d'énergie (hydrolyse d'ATP) sont activés pour faire entrer le métal à l'intérieur de la cellule (mécanisme induit) (**Nies, 1999**). Du fait des similitudes entre les métaux, les non essentiels peuvent suivre accidentellement la même voie que les métaux essentiels, ce qui explique en partie la toxicité des métaux. L'internalisation est l'étape clé du mécanisme d'assimilation des métaux. La formation de complexes entre le métal et les groupements fonctionnels anioniques est un pré-requis à l'assimilation des métaux par les microorganismes. Une fois le métal sorbé, il peut alors être transporté dans l'espace périplasmique et éventuellement dans le cytoplasme. Cela fait intervenir de nombreuses réactions de complexation et des molécules nécessaires pour le transport, le stockage, des liaisons de surface et les fonctions biologiques (**Worms et al., 2006; Haferburg et Kothe, 2007**).



## V. Bioaccumulation de quelques métaux lourds par les bactéries :

### V.1. Bioaccumulation du plomb :

Le plomb peut s'accumuler dans le corps, et son exposition, même à de très faibles doses, peut s'avérer dangereuse. A cause de sa toxicité, beaucoup de chercheurs étudiaient son élimination par des méthodes efficaces et non toxiques (**Ruiz-Fernández et al., 2009 ; Xiao-bing, 2012**). **Piotrowska-Segeta et al. (2005)** ont isolé, à partir de sols pollués par des métaux lourds, deux souches d'entérobactéries, *Serratia fonticola* et *Providencia stuartii* ; ces souches accumulaient jusqu'à 0,4mM de Pb. **Tornabene et Edwards (1972)** ont également montré que le plomb n'avait aucun effet sur le taux de croissance et la viabilité des espèces bactériennes d'eau douce *Azotobacter sp.* Et *Micrococcus luteus*. Par ailleurs, ils ont estimé que plus de 99 % du plomb accumulé se situait au niveau de la membrane. De même, **Piotrowska-Segeta et al. (2005)** ont isolé, à partir de sols pollués par des métaux lourds, deux souches d'entérobactéries, *Serratia fonticola* et *Providencia stuartii*. Ces souches présentaient une CMI au plomb de 0,2-0,3 mM.

### V.2. Bioaccumulation du chrome :

Le potentiel de réduction microbienne de Cr (VI) a été envisagé par plusieurs auteurs pour un temps, cependant, la biosorption et la bioaccumulation de Cr (VI) a attiré l'attention qu'au cours des dernières années seulement (**Bhattacharya et Gupta, 2013**). **Deepa et al.(2006)** ont montré que *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* et *Bacillus coagulans*, sont capables de bioaccumuler près de 100% de Cr(VI) et de faire baisser la concentration de Cr(VI) à 0,06mg/l, ce qui semble admissible. Ainsi, ces isolats peuvent être exploités à des fins pareillement, de bioremédiation lorsque la concentration de Cr(VI) est de 50 mg/ l ou au-dessous. **Deng et Wang P (2012)** ont isolé différentes souches d'origine marine ont montré que les bactéries *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus pasteurii*, *Brevibacterium casei* accumulaient Cr(VI) à des concentration de 150, 300, 100 mg/ L, respectivement.

### V.3. Bioaccumulation du cadmium :

Le cadmium se trouve très souvent dans l'environnement sous forme d'un cation divalent ( $Cd^{2+}$ ). En ce qui concerne l'assimilation du Cd, il semblerait que le Cd peut utiliser les systèmes de transporteurs du magnésium et du manganèse. Par ailleurs **Hao et al. (1999)** ont identifié deux systèmes d'assimilation du Cd chez *Lactobacillus plantarum*: un premier système de haute affinité et rapide d'import de manganèse qui peut aussi transporter le Cd. D'autres auteurs ont également

montré que le Cd peut rentrer dans la cellule via des systèmes de transport du Ca, du Mg, du Mn et du Zn (Slaveykova et al., 2009).

#### V.4. Bioaccumulation du zinc :

Le plus souvent, le zinc se trouve sous forme d'un cation divalent ( $Zn^{2+}$ ) dans l'environnement. C'est un composant de nombreuses enzymes et de protéines. L'assimilation du zinc, comme pour tous les ions essentiels, doit pouvoir se différencier de celles des autres ions structurellement similaires, comme le Cd et le Pb (Silver et Phung, 2005). En général, les bactéries présentent deux systèmes d'importation du Zn. Un système qui présente une haute affinité pour le substrat et qui est couplé à une dépense énergétique, et un système non spécifique, contrôlé par le gradient chimiosmotique à travers la membrane. Le transport spécifique est assuré par différents types de protéines. Il existe également un transport rapide mais moins/non spécifique contrôlé par les systèmes de transport du Mg (montré chez *Cupriavidus metallidurans*) (Blencowe et Morby, 2003).

#### VI.L'élimination des métaux lourds à partir du corps humain :

Les métaux lourds provoquent divers risques pour la santé. Les aliments contaminés par ces éléments toxiques peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine et animale, même à faible concentrations en raison de l'accumulation progressive. Le problème de l'élimination de ces éléments est rendu délicat par le fait de leur activité à des doses souvent très basse. Plusieurs méthodes ont été proposées pour l'élimination de ces métaux (Labioui, 2005).

De nombreux rapports indiquent la biosorption des métaux lourds par les bactéries et les champignons. Le rôle détoxifiant des bactéries lactiques a été l'objet de nombreux travaux.

L'Homme consomme de nombreuses espèces de bactéries lactiques (BL) avec son alimentation, en particulier les produits fermentés, dans lesquels (BL) sont généralement reconnues bénéfiques. Par exemples le lait de chamelle et son dérivé fermenté (le shubat), sont affectés par ces contaminations. Cependant, la fermentation lactique du shubat peut diminuer la disponibilité de ces métaux dans le tractus digestif des consommateurs car, certaines souches de bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus plantarum* L. *manihotivorans* et *L. fermentum* étaient capables de croître en présence de fortes concentrations en métaux lourds et d'absorber ces métaux qui seraient ensuite éliminés dans les selles (Halttunen et al., 2007).

D'après Halttunen, (2007), Les souches éliminatrices de métaux lourds de l'eau les plus efficaces sont *Bifidobacterium longum* 46, *Lactobacillus fermentum* ME3 et *Bifidobacteriumlactis*

*Bd 12*. la capacité maximal d'élimination du cadmium et du plomb par la souche *Lb. longum 46* et de l'ordre de 54,7 mg/g et 175,7 mg/g de biomasse sèche.

Les bactéries lactiques peuvent empêcher l'absorption de métaux lourds dans le corps et leur ingestion orale peut éliminer les métaux lourds de l'organisme de manière efficace lors de la défécation, donc les bactéries lactiques montrant une forte biosorption de métaux lourds, elles peuvent les évacuer du corps efficacement. Ainsi, une détoxification peut être possible (**Hideki et al., 2013**).

## *Matériel et méthodes*

## Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'Université de Jijel, durant la période Mai– Juin de l'année 2014, l'objectif était d'étudier la bioaccumulation de quelques métaux lourds par les bactéries de la tannerie de Jijel et les bactéries lactiques.

Ces expérimentations ont pour but de (1) mesurer l'effet des métaux lourds sur la croissance des bactéries, (2) mesurer la concentration minimale inhibitrice des métaux lourds, (3) étudier le processus de la bioaccumulation des métaux lourds par les différentes bactéries, qui peuvent fournir une alternative intéressante aux méthodes physico-chimiques dont le but est l'élimination des contaminants de l'environnement.

### I. MATERIEL

#### I.1. Les souches bactériennes:

Les souches bactériennes (E1 – E5) utilisées dans cette étude ont été isolées à partir d'une seule origine (boue activée des bassins d'aération de la station d'épuration de la tannerie de Jijel), les souches lactiques (Stsa, L5, J14, S3, 15) ont été isolées à partir de différentes origines (**tableau 2**).

**Tableau2:** Origine des souches utilisées dans cette étude.

Souches	Origine
E1	boue activée (effluent de la tannerie de Jijel).
E2	boue activée (effluent de la tannerie de Jijel).
E3	boue activée (effluent de la tannerie de Jijel).
E4	boue activée (effluent de la tannerie de Jijel).
E5	boue activée (effluent de la tannerie de Jijel).
Stsa: <i>Streptococcus salivarius</i>	Raib
L5: <i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	Tube digestif du lapin
J14: <i>Lactobacillus helveticus</i>	Jabot de poulet
S3 : <i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis</i>	Selle de bébé
15 : <i>Lactobacillus plantarum</i>	Le lait

La pureté des souches bactériennes a été vérifiée en les repiquant individuellement sur gélose nutritive pour les souches (E1-E5), et sur gélose MRS pour les souches (Stsa, L5, J14, S3, 15), les colonies pures sont été isolées.

# **Matériel et méthodes**

---

## **I.2. Les milieux de culture :**

Les différents milieux de culture utilisés pour isoler et caractériser les bactéries lactiques et les bactéries de l'environnement sont :

- Milieu MRS (Man-Rogosa-Sharp) bouillon et gélose (préparé au laboratoire) : utilisé pour la culture des bactéries lactiques
- Gélose MRS (Institut Pasteur)
- Bouillon nutritif (BN) (Institut Pasteur)
- Gélose nutritive (GN) (Institut Pasteur)

## **I.3. Appareillage :**

Le matériel suivant a été utilisé tout au long du travail :

- Bec Bunsen
- Four Pasteur (Controls)
- Bain marie (Gerhardt Bonn)
- Balance (Scout Pro)
- Plaque chauffante agitatrice (Bunsen)
- Etuve (37°C) (Memmert)
- Autoclave (Slli AVX electronic)
- Vortex (Minishaker IKA)
- Réfrigérateur
- pH mètre (Hanna)
- Microscope optique (Paralux)
- Spectrophotomètre (Amercham)
- Centrifugeuse (Hettich EBA20)
- Spectrophotomètre d'absorption atomique (AA-6200 SHIMADZU).
- Filtres millipores 0,22µm (Sartotius)

## **I.4. Produits chimiques et réactifs :**

Au cours de notre travail, nous avons utilisé les réactifs suivants :

- Sel de nitrate de plomb  $Pb(NO_3)_2$ .
- Le dichromate de potassium  $K_2Cr_2O_7$ .
- Violet de Gentiane, lugol, alcool et fuschine (coloration de Gram).
- Tween 80 : Additif du milieu MRS.
- Eau oxygéné ( $H_2O_2$ ) pour le test de la catalase.

## Matériel et méthodes

- L'acide chlorhydrique (HCl) 1N.
- Le chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) 0,05 M.
- L'hydroxyde de sodium (NaOH) 5N.
- Milieu MEVAG. (Institut Pasteur)
- Milieu de Mannitol. (Institut Pasteur)
- Milieu T.S.I. (Institut Pasteur)
- Milieu Clarck et Lubs. (Institut Pasteur)
- Milieu Moeller. (Institut Pasteur)
- Lecitrate de Simmon. (Institut Pasteur)
- Nitrateréductase RN1 et RN2.
- Bouillon nitraté. (Institut Pasteur)
- Milieu urée-indole.
- Rouge de méthyle (RM).
- Réactif de Voges-Proskauer (VP).
- Le réactif de Kovacs.
- Peptone.
- Extrait de viande.
- Extrait de levure.
- Glucose.
- Acétate de sodium.
- Hydrogénophosphate de potassium.
- Sulfate de magnésium heptahydraté.
- Sulfate de manganèse tétra hydraté.
- Agar-Agar.

## Matériel et méthodes

### II. METHODES :

#### II.1. Revivification des souches :

La revivification des souches est une étape essentielle avant chaque test. Les 10 souches ont été ensemencées dans 5ml du milieu approprié (BN ou MRS). Les cultures ont été cultivées à 37° C pendant 24h.

#### II.2. Préparation des solutions mères de métaux lourds :

- **SM1** : Chrome 1.76g/L

$$\text{mM} (\text{K}_2 \text{Cr}_2 \text{O}_7) = 294.2 \text{ g/mol}$$

$$\text{mM} (\text{Cr}) = 52 \text{ g/mol}$$

$$10\text{g} (\text{K}_2 \text{Cr}_2 \text{O}_7) = m (\text{Cr}) * \frac{294.2}{52}$$

$$m (\text{Cr}) = 1.76 \text{ g}$$

10g de dichromate de potassium a été dissous dans 1L de l'eau distillée, donc la solution mere du chrome et de 1760mg /L (**Srinath et al., 2002**).

- **SM2** : plomb 10000ppm

$$\text{mM} (\text{Pb}) (\text{NO}_3)_2 = 331.22 \text{ g/mol}$$

$$\text{mM} (\text{Pb}) = 207.2 \text{ g/mol}$$

La masse de  $\text{Pb} (\text{NO}_3)_2$  pour préparer :

$$m = 10000 * \frac{331.22}{207.2} = 15.9 \text{ g}$$

15.9 g de sel de nitrate de plomb a été dissous dans 1L de l'eau distillée (**Hideki et al., 2013**).

#### II.3. Sélection des souches résistantes aux métaux lourds :

Cette expérience permet de dépister les souches les plus efficaces qui ont la capacité de croître sur le bouillon nutritif ou le bouillon MRS contenant le Cr ou le Pb. Les souches purifiées (E1-E5) ont été cultivées dans 20ml de bouillon nutritif avec une concentration de 7mg/l de Cr (**Srinath et al., 2002**). La même méthode a été utilisée pour la sélection des souches résistantes au Pb, sauf que la concentration du plomb utilisée était de 100 ppm (**Xiao-bing et al., 2012**).

## Matériel et méthodes

Pour les bactéries lactiques les souches purifiées (Stsa, L5, J14, S3, 15), ont été inoculées dans 20ml de bouillon MRS avec une concentration de 7mg/l de Cr. La même méthode a été utilisée pour la sélection des souches résistantes au Pb, sauf que la concentration du plomb utilisée était de 100 ppm. Les cultures ont été incubées à 37 ° C pendant 48h, les mesures de densité optique à 600 nm ont été effectuées chaque 3h pour sélectionner les souches les plus résistantes aux métaux lourds.

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

Les souches bactériennes utilisées ont été activées sur le bouillon approprié, ensuite les cellules ont été recueillies par centrifugation et lavées deux fois avec de l'eau distillée stérile. Une série de dilution a été réalisée dans l'eau physiologique. Les dilutions correspondant aux densités optiques à 600nm suivantes ont été utilisées pour un dénombrement des cellules viables sur la gélose appropriée : 0.006, 0.1, 0.6 et 1. Après étalement sur gélose, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h. Les colonies ont été dénombrées.

### II.5. Calcul du taux de croissance :

- Pour calculer le taux de croissance nous avons utilisé l'équation suivante (Wei et al., 2009) :

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

$DO_t$  : densité optique dans une valeur du temps.

$DO_0$  : densité optique du temps initial.

$\mu$  : le taux de croissance.

$T_t$  : le temps après l'incubation.

$T_0$  : le temps initial.

### II.6. Caractéristiques biochimiques et morphologiques des souches sélectionnées :

Les quatre souches capables de se développer dans le bouillon sélectif contenant le métal (Cr /Pb), ont été identifiées par des tests morphologiques et biochimiques. Chaque colonie purifiée a été prélevée et diluée, colorée avec la coloration de Gram et observée au microscope optique.

Les tests biochimiques suivants ont été réalisés (Vos et al., 2009):

- **Test de Fermentation des sucres** : Ce test est réalisé sur le milieu MEVAG afin de déterminer le type de métabolisme glucidique (fermentation ou oxydation).



## **Matériel et méthodes**

---

- **Test de dégradation de mannitol** : le milieu mannitol - mobilité permet d'étudier la dégradation du mannitol et de la motilité des souches bactériennes.
- **Test de fermentation des trois sucre (TSI)**:le milieu TSI contient trois sucres glucose, lactose et saccharose), ce test est utilisé pour déterminer si les bactéries peuvent fermenter le glucose et / ou du lactose et si elles peuvent produire du sulfure d'hydrogène ou d'autres gaz.
- **Test de rouge de méthyle (RM)** : ce test a été utilisé pour déterminer la fermentation acide mixte.
- **Test de Voges- Proskauer (VP)** : ce test permet de caractériser la présence d'acétyl-méthyl-carbinol (acétoine).
- **Test de nitrate réductase** : ce test est réalisé pour déterminer la capacité des micro-organismes de réduire le nitrate en nitrite ou au-delà du stade de formation de l'ammoniac.
- **Test de production d'indole** : Ce test est utilisé pour déterminer la capacité du microbe à dégrader le tryptophane.
- **Test d'utilisation Citrate** : Pour déterminer la capacité des microbes à fermenter le citrate comme seule source de carbone.
- **Test de la catalase** : Ce test a été utilisé pour déterminer la capacité des microbes à produire la catalase.
- **Recherche des décarboxylases** (Arginine dihydrolase (ADH), Ornithine décarboxylase (ODC), lysine décarboxylase (LDC)).

### **II.7. Effet des métaux lourds sur la croissance des souches :**

Les souches les plus efficaces capables de résister aux métaux lourds (E1 et E4), (Stsa et 15) ont été choisies pour ce test; le but est de comparer la croissance des souches en présence et en absence des métaux.

#### **II.7.1. Préparation de l'inoculum :**

Les souches (E1 et E4) ont été inoculées dans deux tubes de bouillon nutritif, et les souches (Stsa et 15) ont été inoculées dans deux tubes de bouillon MRS. Les tubes ont été incubés à 37° C pendant 24h. Après le temps d'incubation les cultures ont été centrifugées pendant 10min à 6000g, le culot a été dissous dans l'eau distillée stérile pour atteindre une DO à 600nm de (0.23, 0.29, 0.123 et 0.135) pour les souches (E1, E4, Stsa et 15), respectivement (Siripornadulsil et Siripornadulsil, 2013).

#### **II.7.2. Suivi de la croissance des bactéries en absence et en présence de métaux lourds :**

La souche (E4) préalablement activée a été inoculé dans deux tubes contenant 20ml de bouillon nutritif, l'un des deux tubes a été additionné d'une concentration de 7mg/L de Cr. De la

## **Matériel et méthodes**

---

même manière la souche (E1) a étéensemencée sauf que l'un des tubes est additionné d'une concentration de 100 ppm de Pb.

Les souches de bactéries lactiques (L1 et L5) ont été cultivées dans le milieu MRS avec et sans métaux lourds. Les concentrations finales en Cr et Pb étaient 7mg/L et 100ppm, respectivement. Les cultures ont été incubées à 37° C pendant 48h, les mesures des densités optiques à 600 nm ont été effectuées chaque 3h, pour mesurer l'effet des métaux lourds sur la croissance des souches sélectionnées.

### **II.8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :**

Ce test a été réalisé selon le protocole rapporté par (Aleem *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2008). Le but de ce test est de déterminer la concentration minimale inhibitrice. Les souches bactériennes ont été cultivées dans le bouillon nutritif (pour les souches E1 et E4), et le bouillon MRS (pour les souches Stsa et 15). Après incubation une centrifugation a été faite pendant 10min à 6000g, le culot a été dissout dans l'eau distillée pour atteindre une DO à 600nm de 0.1, 1ml de la suspension bactérienne (E1) a été transféré dans chaque tubes contenant des concentrations croissantes en Pb (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000ppm) obtenues à partir de la solution mère (SM2). 1ml de la suspension bactérienne (E4) a été transféré dans chaque tube contenant des concentrations croissantes en chrome (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/l) obtenues à partir de la solution mère (SM1) ayant une concentration de 10000 mg/l en Cr.

La même technique a été appliquée pour les souches (L1 et L5) sauf que le volume de l'inoculum était égal à 0,1ml. Le volume des tubes a été complété avec le bouillon approprié (BN ou MRS) jusqu'à l'obtention de 10 ml dans chaque tube. Chaque tube a été accompagné d'un tube blanc qui contient les mêmes composants sauf la souche. Les densités optiques à 600 nm ont été mesurées après 48 h, et la plus faible concentration de métaux lourds au cours de laquelle aucune croissance n'a pu être observée a été considérée comme la CMI (Jiang *et al.*, 2008).

### **II.9. Bioaccumulation de Cr et Pb par les souches bactériennes :**

#### **II.9.1. Bioaccumulation de Chrome :**

Deux erlenmeyers contenant 100ml de bouillon nutritif dont l'un d'eux a été supplémenté par le Cr à une concentration égale à 10mg/L ont été utilisés, chacun a étéensemencé par 1% de la culture bactérienne (E4) préalablement activée. De la même manière la souche lactique (Stsa) a été transférée a deux erlenmeyers contenant du bouillon MRS avec et sans Cr à 10mg/L. Les erlenmeyers ont été incubés à 37°C pendant 48h (Costa et Duta, 2001; Deng et Wang, 2012).

### **II.9 .2. Bioaccumulation du Plomb :**

Deux erlenmeyers contenant 100ml de bouillon nutritif dont l'un d'eux a été supplémenté par le Pb à une concentration égale à 100ppm ont été employés, chacun a étéensemencé par 1% de la culture bactérienne (E1) préalablement activée. D'autre part, la souche lactique (15) a été transférée à deux erlenmeyers contenant du bouillon MRS avec et sans Pb à 100ppm. Les erlenmeyers ont été incubés à 37°C pendant 48h (Nithya et al., 2011).

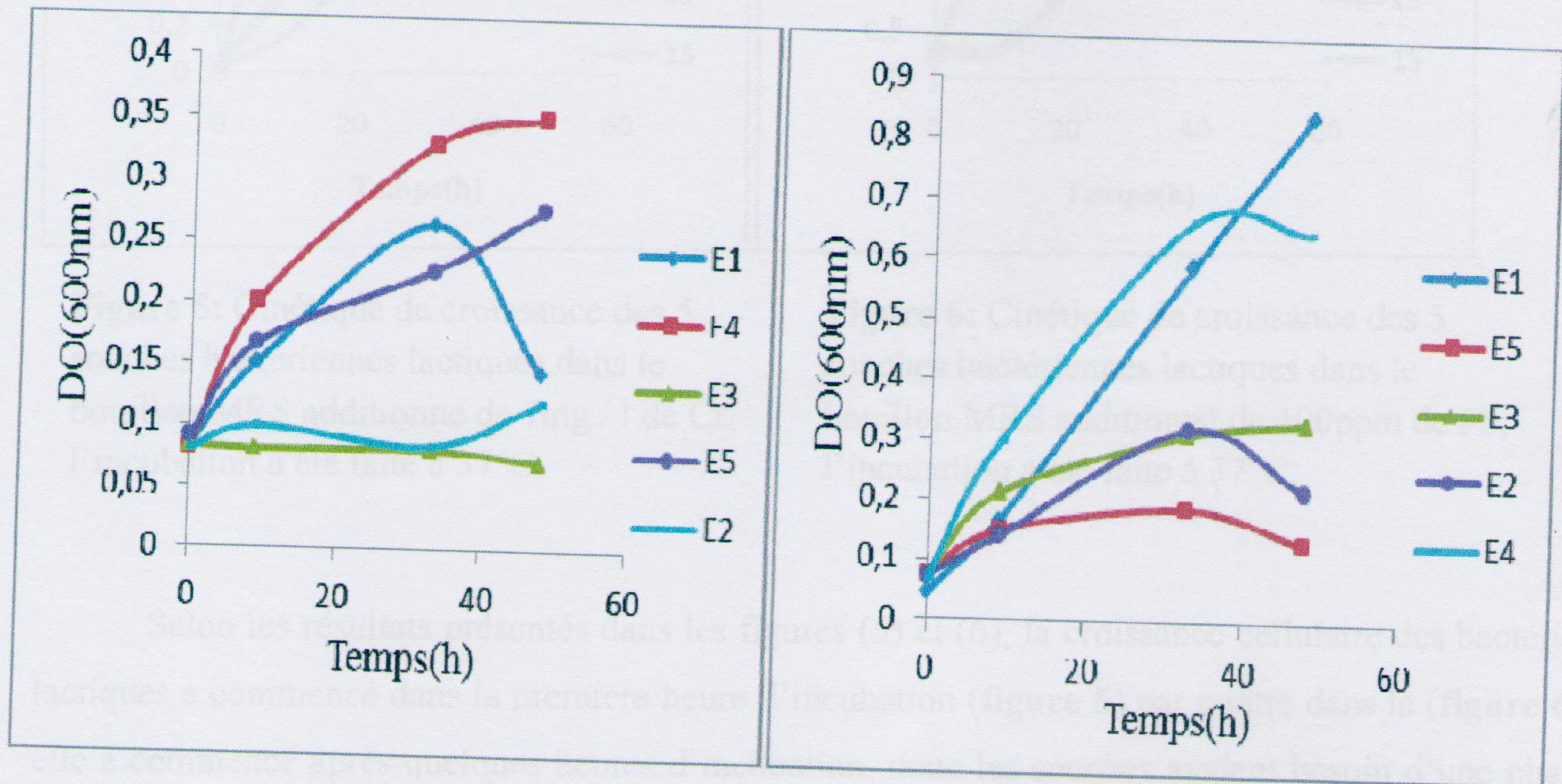
### **II.8.3. Lyse des cellules :**

Après le temps de l'incubation, les cellules bactériennes ont été recueillies par centrifugation à 6000g pendant 10min. Le culot ainsi obtenu a été lavé trois fois avec l'eau deionisée. La lyse des cellules a été induite en ajoutant 5ml d'acide nitrique à 1%. Après incubation pendant 24h à 4°C. Le lysat bactérien a été centrifugé pendant 10min à 6000g. Le surnagent a été filtré par des filtres millipores 0,22µm et analysé par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) (Wu et al., 2006; Nithya et al., 2011 ; Deng et Wang, 2012 ).

## Résultats et discussion

### I. Criblage des souches résistantes au métal :

Ce test vise à sélectionner les souches de bactéries qui ont la capacité de croître sur le bouillon approprié contenant du Cr ou du Pb. La croissance des cellules bactériennes a été déterminée en mesurant la densité optique à 600 nm et ce chaque 3h pendant 48h, les résultats sont montrés dans les figures : (3) et(4) pour les bactéries issues de la boue activée et les figures (5) et(6) pour les bactéries lactiques.

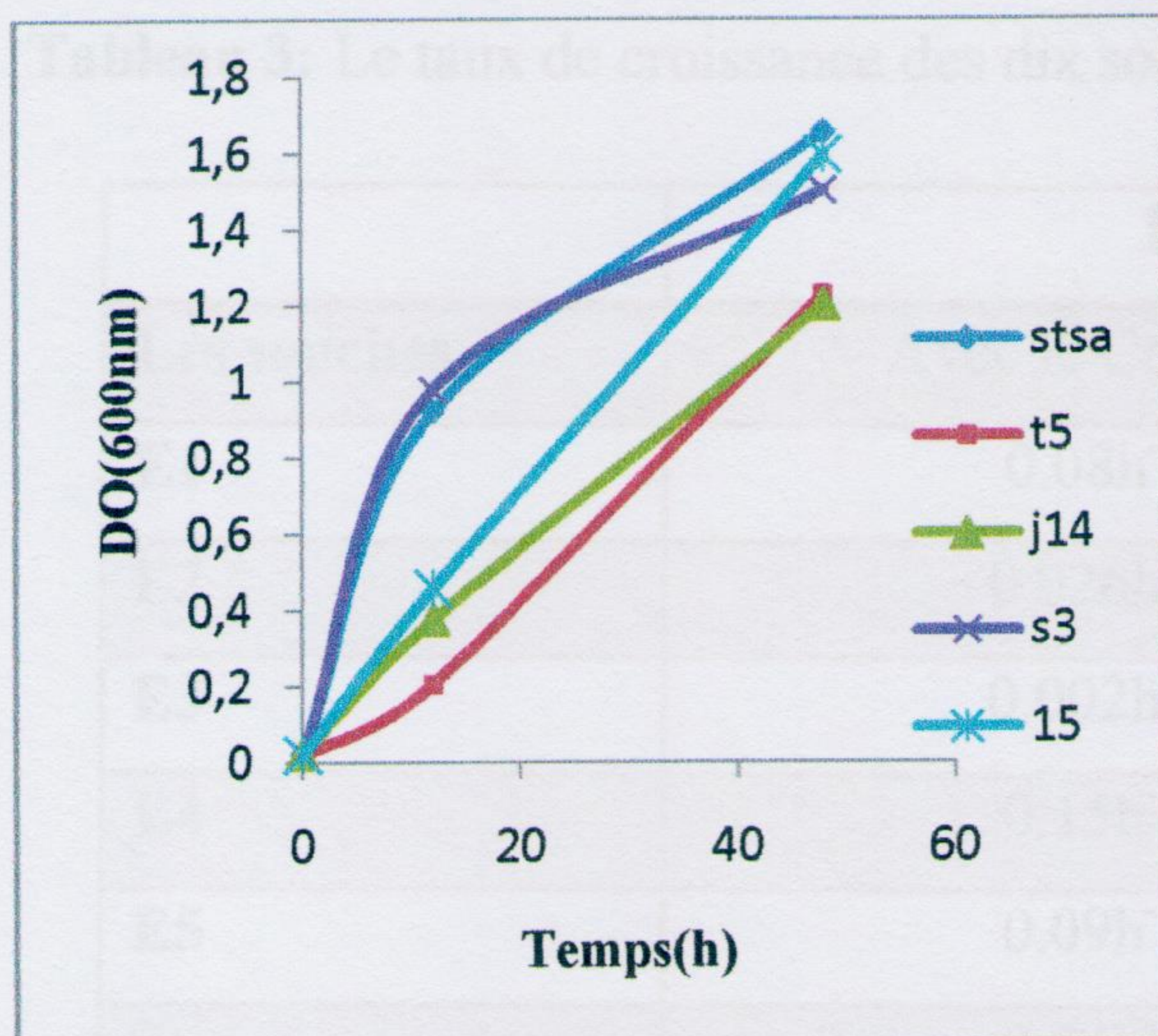


**Figure 3:** Cinétique de croissance des 5 souches bactériennes de l'environnement dans le bouillon nutritif additionné de 7 mg / l de Cr, l'incubation a été faite à 37°C.

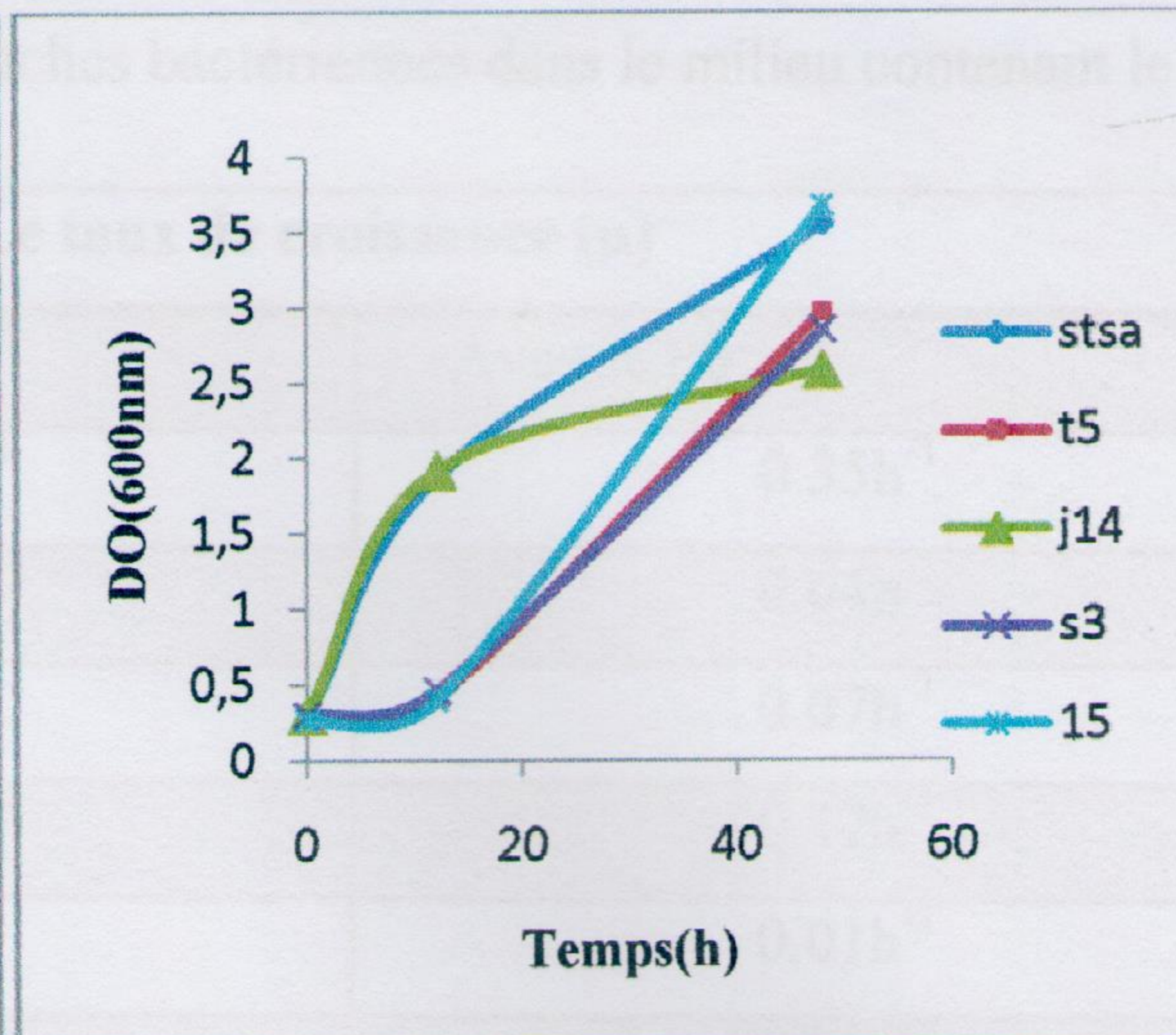
**Figure 4:** Cinétique de croissance des 5 souches bactériennes de l'environnement dans le bouillon nutritif additionné de 100ppm de Pb, l'incubation a été faite à 37°C.

D'après les résultats présentés dans les figures (3) et (4), la croissance cellulaire a commencé dans la première heure d'incubation pour toutes les souches testées (absence d'une phase de latence) par ce que les souches sont isolées précédemment a partir d'un site pollué par les métaux lourds, donc elles sont adaptées avec le milieu. Les souches (E4 ; fig.3) et (E1 ; fig.4) ont montré une croissance rapide et maximale après 48 h avec un taux de croissance élevé (E1:0.35h<sup>-1</sup>) et (E4 : 0.15h<sup>-1</sup>) (tableau 3), alors que les autres souches (E1, E2, E3, E5 ; fig.3) et ( E2, E3, E4, E5 ; fig.4) ont atteint leur niveau maximal de croissance après 48h d'incubation avec un faible taux de croissance, ensuite une diminution de la croissance cellulaire a été observée.

## Résultats et discussion



**Figure 5:** Cinétique de croissance des 5 souches bactériennes lactiques dans le bouillon MRS additionné de 7mg / l de Cr, l'incubation a été faite à 37°C.



**Figure 6:** Cinétique de croissance des 5 souches bactériennes lactiques dans le bouillon MRS additionné de 100ppm de Pb, l'incubation a été faite à 37°C.

Selon les résultats présentés dans les figures (5) et (6), la croissance cellulaire des bactéries lactiques a commencé dans la première heure d'incubation (**figure 5**) par contre dans la (**figure 6**), elle a commencé après quelques heures d'incubation, donc les souches avaient besoin d'une phase de latence pour s'adapter avec les milieu ce qui indique que les bactéries ont un système spécifique d'adaptation et de résistance pour chaque métal. Les souches (Stsa; **fig.5**) et (15; **fig.6**) ont montré la croissance la plus rapide et maximale, et un taux de croissance plus élevé (Stsa :  $0.54h^{-1}$  et 15 :  $0.25h^{-1}$ ) (tableau3) par rapport aux autres souches (L5, J14, S3, 15; **fig.5**) et (Stsa, L5, J14, S3; **fig.6**).

Parmi les 10 souches bactériennes, (E1, E4, Stsa et 15) sont les souches qui ont été sélectionnées en raison de: (I) leur croissance plus rapide et maximale, (II) leur degré élevé de tolérance aux métaux et (III) leur taux de croissance élevé (**tableau 3**).

### II. Identification partielle des souches sélectionnées :

Cette étape a permis d'identifier partiellement les souches sélectionnées par des tests morphologiques et biochimiques. L'observation macroscopique des souches bactériennes sélectionnées a révélé que la première souche (E4) apparaît sous forme de colonies blanchâtre volumineuses (4 à 5mm de diamètre), la seconde souche (E1) apparaît sous forme de colonies pigmentées de couleur orange, la troisième et la quatrième souche (Stsa) et (15) sont

## Résultats et discussion

**Tableau 3:** Le taux de croissance des dix souches bactériennes dans le milieu contenant le métal.

Les souches	Le taux de croissance ( $\mu$ )	
	Avec le Cr	Avec le Pb
E1	0.08h <sup>-1</sup>	0.35h <sup>-1</sup>
E2	0.026h <sup>-1</sup>	0.04h <sup>-1</sup>
E3	0.002h <sup>-1</sup>	0.07h <sup>-1</sup>
E4	0.15h <sup>-1</sup>	0.17h <sup>-1</sup>
E5	0.09h <sup>-1</sup>	0.01h <sup>-1</sup>
Stsa	0.54h <sup>-1</sup>	0.22h <sup>-1</sup>
L5	0.15h <sup>-1</sup>	0.19h <sup>-1</sup>
J14	0.11h <sup>-1</sup>	0.19h <sup>-1</sup>
S3	0.40h <sup>-1</sup>	0.14h <sup>-1</sup>
15	0.49h <sup>-1</sup>	0.25h <sup>-1</sup>

Les souches (E4, E1, Stsa et 15) sont capables de continuer leur croissance en présence de Cr et de Pb, ceci peut être en accord avec les résultats de **Legret et ses collaborateurs (1984)**, qui ont constaté que certaines bactéries sont susceptibles de concentrer les métaux dans le cytoplasme ou de les fixer par adsorption sur la membrane cellulaire, aussi bien que **Oger et ses collaborateurs (1999)** qui ont trouvé que ces bactéries dont le développement est avantage dans un biotope pollué, possèdent des systèmes de résistance qui reposent soit sur des propriétés de biosorption, soit sur l'acquisition de gènes spécifiques. De la même façon **Srinath et ses collaborateurs (2002)** ont étudié soixante souches bactériennes résistantes au Cr (VI), ils ont trouvé que la sensibilité des bactéries à la toxicité des métaux est liée à leur site d'isolement. Aussi bien que, **Wei et ses collaborateurs (2009)** ont étudié 108 souches isolées à partir du sol, la sélection des souches résistantes aux métaux lourds a été réalisée en accord avec les valeurs élevées du taux de croissance de ces souches.

### II. Identification partielle des souches sélectionnées :

Cette étape a permis d'identifier partiellement les souches sélectionnées par des tests morphologiques et biochimiques. L'observation macroscopique des souches bactériennes sélectionnées a révélé que la première souche (E4) apparait sous forme de colonies blanchâtre volumineuses (4 à 5mm de diamètre), la second souche (E1) apparait sous forme de colonies pigmentées de couleur orange, la troisième et la quatrième souche (Stsa) et (15) sont

## Résultats et discussion

apparaissent sous forme de colonies blanchâtres, lisses, rondes, légèrement bombées, qui sont identifiées précédemment (*Streptococcus salivarius* et *Lactobacillus plantarum*), les résultats des tests biochimiques et physiologiques obtenus sont résumés dans (le tableau 4).

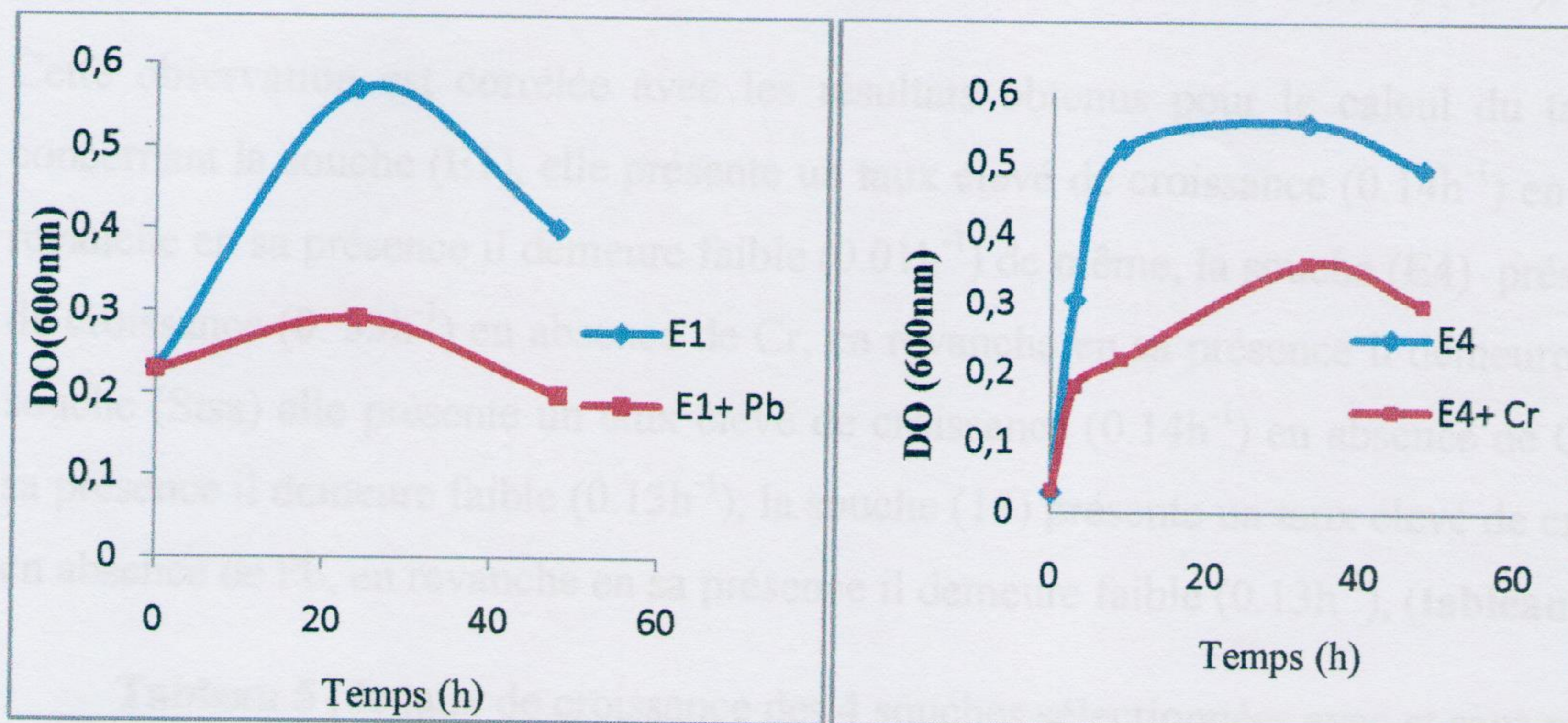
**Tableau 4:** Caractères biochimiques et morphologiques des souches sélectionnées de l'environnement.

Caractères biochimiques et morphologiques	E1	E4
Gram	Bacille à Gram+	Bacille à Gram+
Type de respiratoire	AAF	Anaérobie
Catalase	+	+
Mannitol	-	-
Mobilité	-	+
Glucose	+	+
Lactose	-	-
Saccharose	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-
Gaz	-	-
RM	+	+
VP	-	-
Nitrate réductase	+	-
ADH	-	-
ODC	+	-
LDC	+	-
Citrate De Simmons	-	-

Selon la deuxième édition du Bergey's Manuel, nous pouvons probablement assimiler les souches : (E1), (E4) au genre *Rhodococcus ssp.* et *Bacillus ssp.* Toutefois, d'autres tests sont nécessaires pour confirmer l'espèce (Vos et al., 2009).

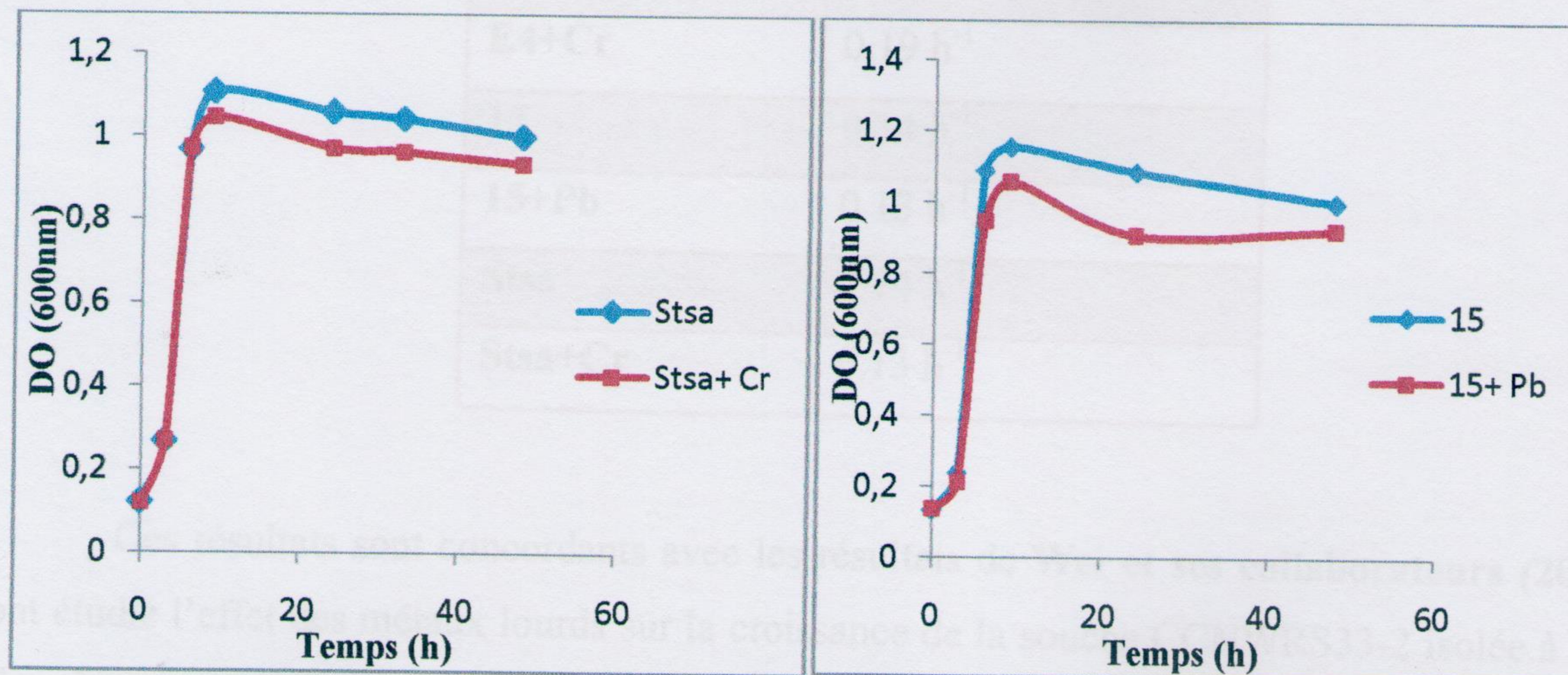
### III. Effet des métaux lourds sur la croissance des souches sélectionné :

Ce test permet de montrer l'effet des métaux lourds sur la croissance des souches bactériennes sélectionnées, les mesures de la densité optique à 600 nm, ont été réalisées chaque 3h figures (7, 8, 9 et 10).



**Figure 7:** Cinétique de croissance de la souche sélectionnée (E1), en présence et en absence du Pb, l'incubation a été faite à 37°C.

**Figure 8:** Cinétique de croissance de la souche sélectionnée (E4), en présence et en absence du Cr, l'incubation a été faite à 37°C.



**Figure 9:** Cinétique de croissance de la souche sélectionnée (Stsa), en présence et en absence du Cr, l'incubation a été faite à 37°C.

**Figure 10:** Cinétique de croissance de la souche sélectionnée (15) en présence et en absence du Pb, l'incubation a été faite à 37°C.



## Résultats et discussion

Les figures (7, 8, 9 et 10) montrent que la croissance des souches (E1, E4, Stsa et 15) était plus élevée en absence du Cr et du Pb, on revanche lorsque le milieu approprié est supplémenté du Cr ou du Pb la croissance des souches a été réduite de manière significative, ce qui indique que ces métaux présentent un degré de toxicité sur la croissance des souches (E1), (E4), (Stsa) et (15).

Cette observation est corrélée avec les résultats obtenus pour le calcul du taux de croissance, concernant la souche (E1), elle présente un taux élevé de croissance ( $0.14h^{-1}$ ) en absence de Pb, en revanche en sa présence il demeure faible ( $0.01h^{-1}$ ) de même, la souche (E4) présente un taux élevé de croissance ( $0.33h^{-1}$ ) en absence de Cr, en revanche en sa présence il demeure faible ( $0.19h^{-1}$ ), la souche (Stsa) elle présente un taux élevé de croissance ( $0.14h^{-1}$ ) en absence de Cr, en revanche en sa présence il demeure faible ( $0.13h^{-1}$ ), la souche (15) présente un taux élevé de croissance ( $0.14h^{-1}$ ) en absence de Pb, en revanche en sa présence il demeure faible ( $0.13h^{-1}$ ), (tableau 5).

**Tableau 5** : le taux de croissance des 4 souches sélectionnées avec et sans métaux.

Souches	Le taux de croissance
E1	$0.14 h^{-1}$
E1+Pb	$0.01 h^{-1}$
E4	$0.33 h^{-1}$
E4+Cr	$0.19 h^{-1}$
15	$0.14 h^{-1}$
15+Pb	$0.13 h^{-1}$
Stsa	$0.14 h^{-1}$
Stsa+Cr	$0.13 h^{-1}$

Ces résultats sont concordants avec les résultats de **Wei et ses collaborateurs (2009)** qui ont étudié l'effet des métaux lourds sur la croissance de la souche CCNWR33-2 isolée à partir de l'environnement, ils ont trouvé que son taux de croissance était faible lorsque le milieu est supplémenté par le Pb.

### IV. La concentration minimale inhibitrice (CMI):

Ce test, permet de déterminer le seuil de résistance des bactéries sélectionnées au Cr et au Pb. La plus faible concentration de chrome dans laquelle aucune croissance de la souche (E4) n'a pu être observée a été : 50mg/L, d'autre part, la plus faible concentration de plomb dans laquelle aucune croissance de la souche (E1) n'a pu être observée a été : 600 ppm. La CMI de la souche (15) pour le Pb a été égale à 600 ppm, d'autre part, la CMI de la souche (Stsa) pour le Cr n'a pas pu être déterminée, car elle a une résistance très élevée au chrome.

Les résultats d'autres auteurs **Srinath et ses collaborateurs (2002)** ont trouvé que la CMI de trois espèces du Genre *Bacillus* au Cr était égale à 100mg/L ce qui est supérieur à nos valeurs obtenues pour la CMI de la souche *Bacillus ssp* (E4). Cette différence dans la concentration critique peut avoir plusieurs explications : I) la méthode de détermination de la CMI (en milieu liquide, en milieu solide en utilisant des disques ou par incorporation), II) type de milieu (milieu riche ou pauvre), III) nature du sel métallique utilisé, IV) 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.

Pour le plomb **Xiao-bing et ses collaborateurs (2012)** ont montré que treize souches isolées à partir du sol présentaient une CMI de 800ppm, ces résultats sont proches de nôtres pour la CMI des *Lactobacillus plantarium* et *Rhodococcus ssp*.

### V. Test de bioaccumulation des métaux lourds :

Ce test permet d'étudier le processus de la bioaccumulation des métaux (Cr et Pb) par les souches bactériennes sélectionnées en présence et en absence des métaux, sachant que la concentration initiale de Cr était de 50mg/L et celle du Pb était de 100ppm et que chaque essai a été accompagné par un témoin qui ne contient pas de métal. Les valeurs obtenues sont mesurées par la SAA, les résultats sont exprimés en ppm. Après la lyse des cellules nous avons obtenu une concentration de 0,14ppm de chrome pour les souches E4 et Stsa, d'autre part, nous avons obtenu une concentration de 64.64 et 68.24ppm de plomb pour les souches E1 et 15, respectivement. En comparant les concentrations obtenues avec celles des témoins qui présentent des concentrations très faibles en métaux (hors de la gamme de la courbe d'étalonnage du Cr et de Pb (**Annexes 13 et 14**)), ceci suggère que nos souches sont capables d'accumuler le Cr et le Pb (**figures 11, 12, 13 et 14**).

## Résultats et discussion

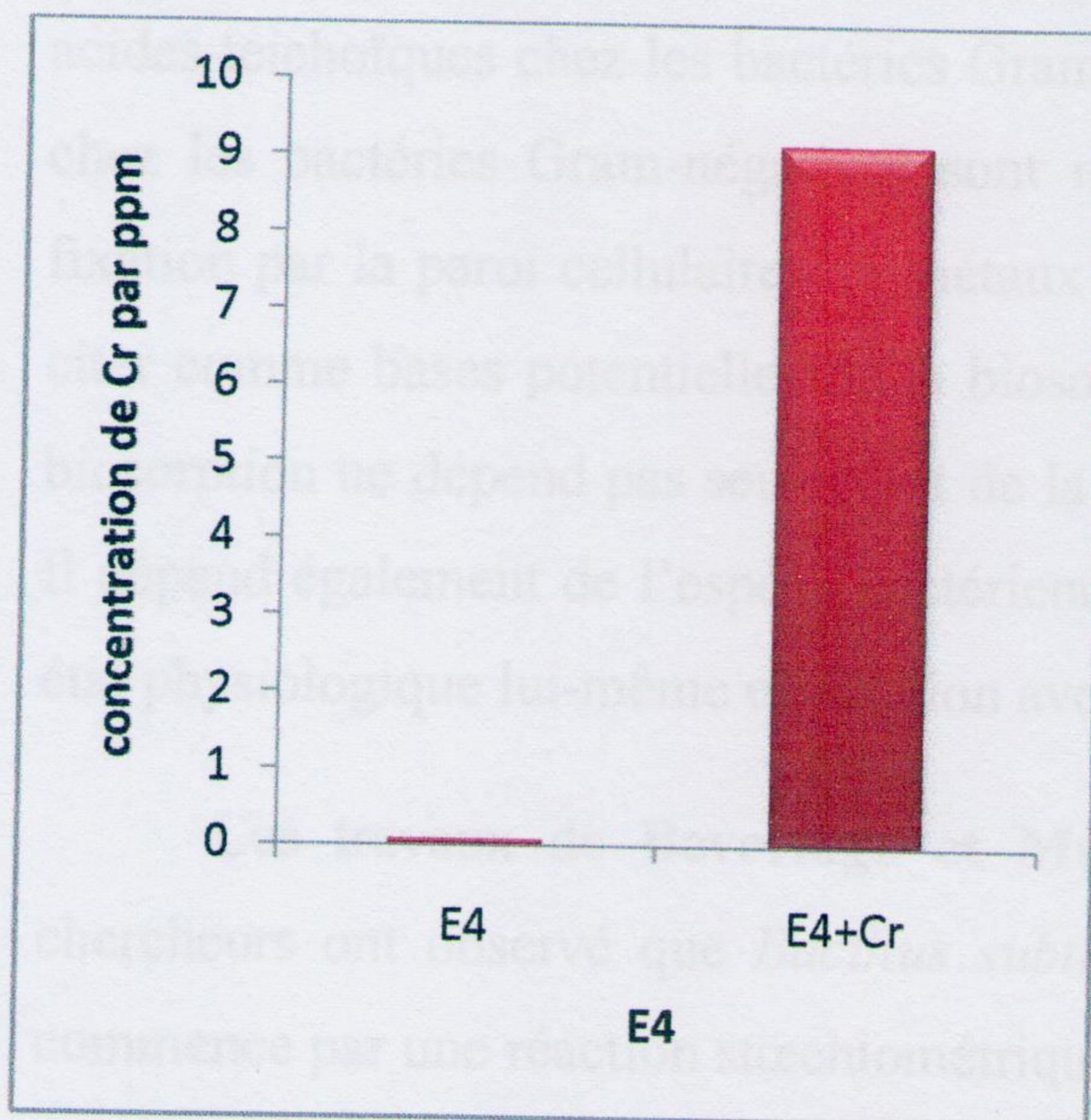


Figure 11 : bioaccumulation du chrome par la souche (E4).

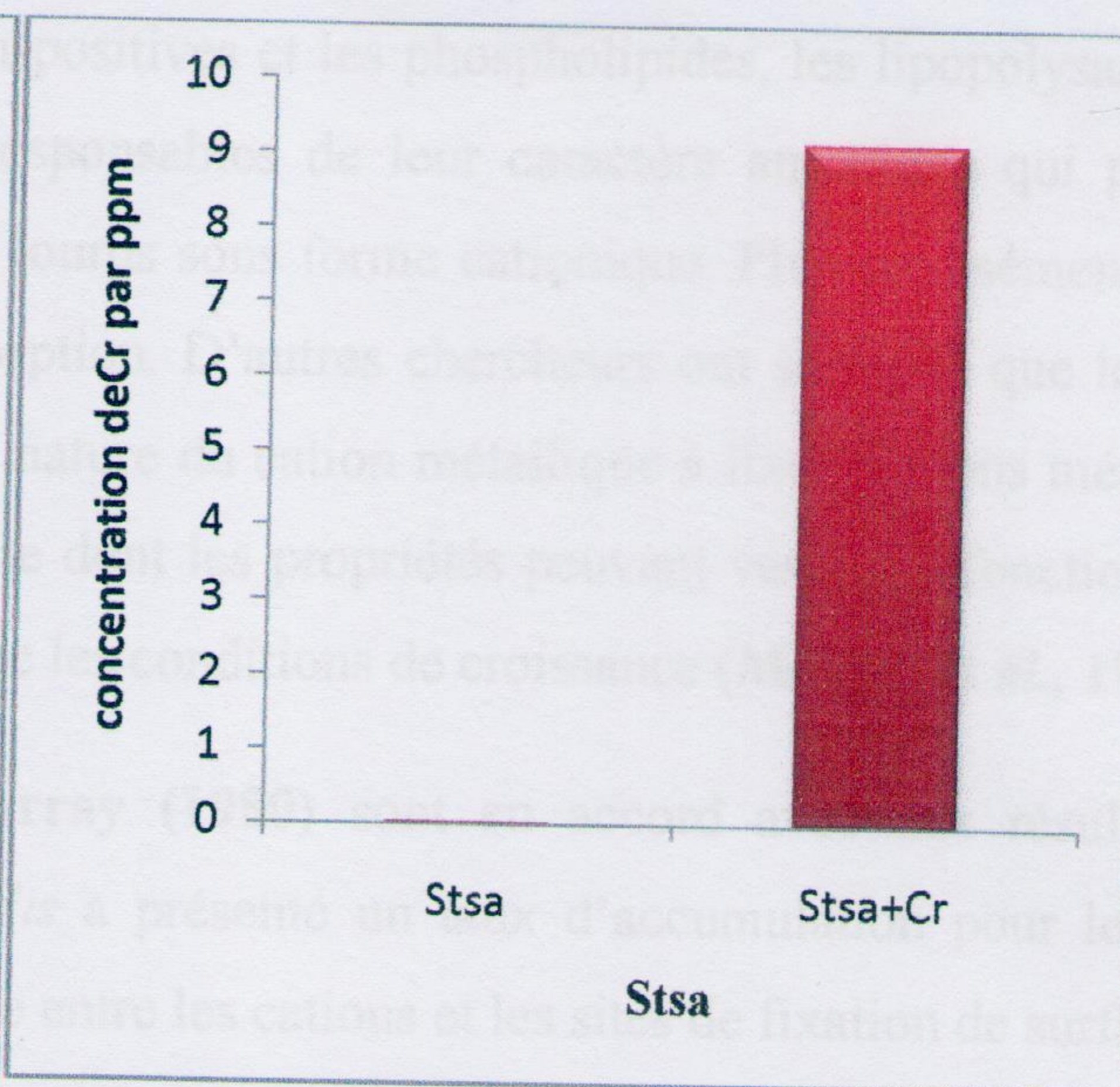


Figure 12 : bioaccumulation du chrome par la souche (Stsa).

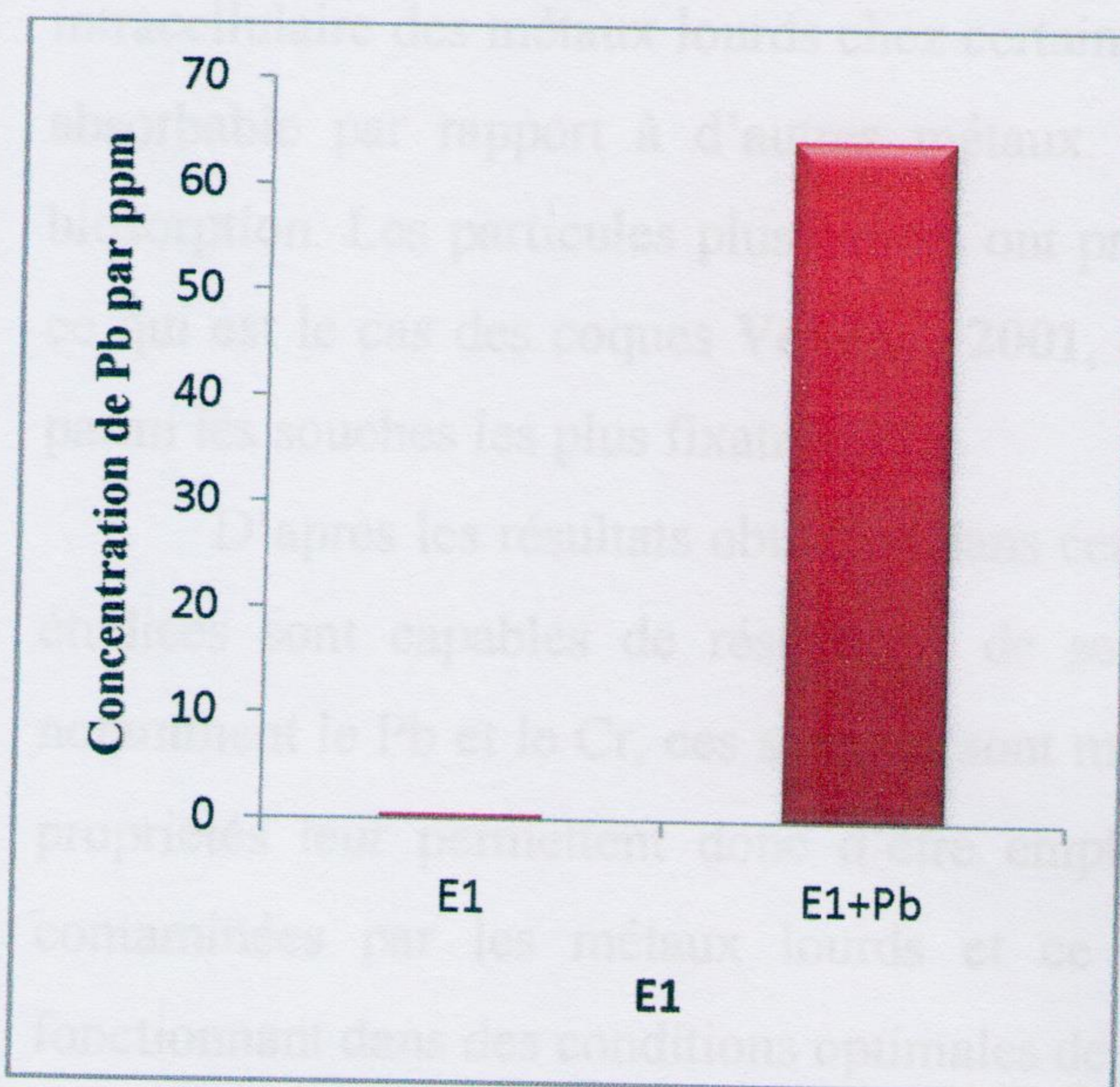


Figure 13 : bioaccumulation du plomb par la souche (E1).

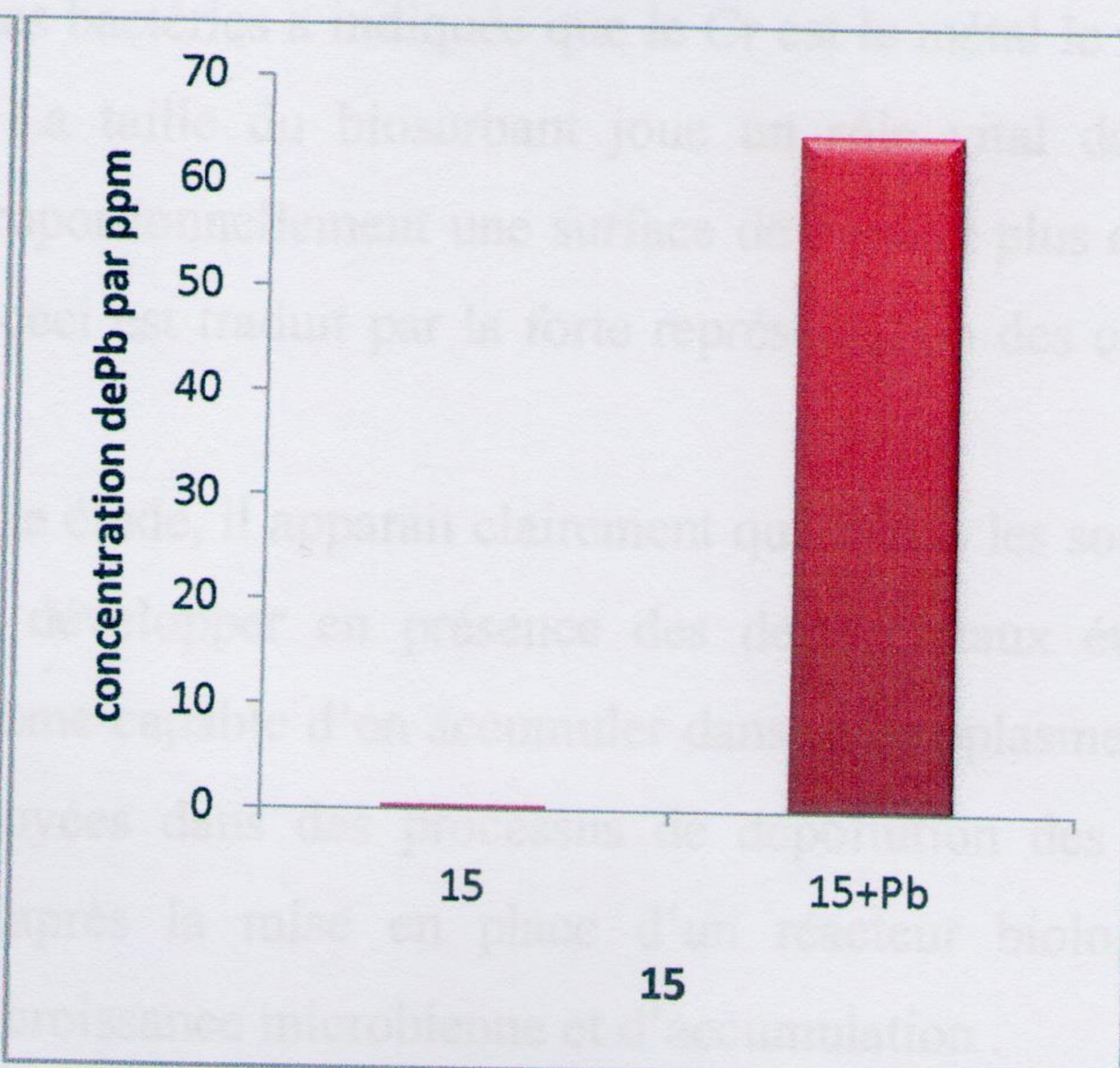


Figure 14 : bioaccumulation du plomb par la souche (15).

Les quartes souches sélectionnées semblent capables d'accumuler les métaux lourds notamment le Pb et le Cr, toutefois la concentration du métal accumulé diffère d'une souche à l'autre. **Halttunen et ses collaborateurs (2007)** ont noté que l'utilisation de la biomasse bactérienne pour l'élimination des métaux lourds est rendue possible en raison des propriétés de surface de la paroi bactérienne. Les groupements fonctionnels présents dans le peptidoglycane, les

## Résultats et discussion

---

acides teichoïques chez les bactéries Gram-positives et les phospholipides, les lipopolysaccharides chez les bactéries Gram-négatives sont responsables de leur caractère anionique qui permet la fixation par la paroi cellulaire des métaux lourds sous forme cationique. Plus précisément on peut citer comme bases potentielles de la biosorption. D'autres chercheurs ont souligné que le taux de biosorption ne dépend pas seulement de la nature du cation métallique à fixer les ions métalliques. Il dépend également de l'espèce bactérienne dont les propriétés peuvent varier en fonction de son état physiologique lui-même en relation avec les conditions de croissance (Mclean et al., 1992).

Les travaux de **Beveridge et Murray (1980)** sont en accord avec nos résultats, ces chercheurs ont observé que *Bacillus subtilis* a présenté un taux d'accumulation pour le Cr, qui commence par une réaction stœchiométrique entre les cations et les sites de fixation de surface, puis se termine par le dépôt du métal inorganique à l'intérieur de la cellule.

Les concentrations du Cr accumulés sont relativement faibles, ceci a été également évoqué par **Bhattacharya et Gupta, (2013)** qui ont affirmé dans leur étude que les mesures de l'accumulation intracellulaire des métaux lourds chez certaines bactéries a indiqué que le Cr est le métal le moins absorbable par rapport à d'autres métaux. La taille du biosorbant joue un rôle vital dans la biosorption. Les particules plus petites ont proportionnellement une surface de contact plus élevée ce qui est le cas des coques **Volesky, 2001**, ceci est traduit par la forte représentation des coques parmi les souches les plus fixatrices.

D'après les résultats obtenues dans cette étude, il apparaît clairement que toutes les souches étudiées sont capables de résister et de se développer en présence des deux métaux étudiés notamment le Pb et le Cr, ces souches sont même capable d'en accumuler dans le cytoplasme. Ces propriétés leur permettent donc d'être employées dans des processus de dépollution des eaux contaminées par les métaux lourds et ce après la mise en place d'un réacteur biologique fonctionnant dans des conditions optimales de croissance microbienne et d'accumulation.

Nos bactéries lactiques étant capables d'accumuler les métaux, ouvrent la voie pour l'étude de leur pouvoir détoxifiant qui s'ajoute aux maintes propriétés probiotiques bénéfiques pour l'Homme.

## Conclusion

---

Notre étude a porté principalement sur l'étude de la bioaccumulation des métaux lourds qui sont, le chrome et le Plomb, qui ont été mis en contact avec des bactéries sélectionnées précédemment, pour leur résistance et leur croissance en présence des métaux lourds, nos résultats ont révélé que ces métaux lourds présentent un degré de toxicité relativement faible pour les souches bactériennes avec une CMI de Cr  $\geq 250$  pour la souche *Bacillus*(E4), et une CMI de Pb  $\geq 600$  pour la souche *Lactobacillus plantarum* (15) d'autre part, les résultats du test de la bioaccumulation des métaux ont permis de confirmer notre hypothèse concernant les quatre souches qui ont été sélectionnées dans notre étude et qui présentaient un degré élevé de résistance au métaux lourds par rapport aux autres souches testées, elles peuvent également accumuler des concentrations remarquables de métaux lourds.

Donc, cette étude a montré l'existence d'interactions entre les métaux lourds et les bactéries de l'environnement et les bactéries lactiques. Ces résultats préliminaires semblent toutefois indiquer un rôle détoxifiant de ces bactéries.

En définitif, ce travail, s'il fixe des résultats certains, ouvre des perspectives et des pistes de recherche, tant au niveau de la connaissance scientifique, qu'à celui d'une possibilité d'utiliser ces microorganismes pour minimiser l'effet toxiques des métaux lourds sur l'environnement et aussi sur la santé humaine, par injection des bactéries lactiques, cette étude préliminaire mérite d'être approfondie afin de mettre le point sur les mécanismes de tolérance montrés par ces bactéries, et d'exploiter leurs propriétés dans la bioremédiation des eaux polluées ou dans la détoxification chez l'Homme.

## Références bibliographiques

---

### A

**Aleem A., Isar J. et Malik A.** (2003). Impact of long-term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizosphere soil. *Bioresource Technology*. 86: 7–13.

### B

**Beveridge T. et Murray R.** (1980). Site of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 141: 876-887.

**Bhaskar P.V. et Bhosle B.** (2006). Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): A carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environment International*. 32: 191–198.

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

**Blencowe D. et Morby A.** (2003). Zn (II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 27: 291-311.

**Boularab I., Bahafid W., Joutey N., Sayel H., El Jaafari S. et El Ghachtouli N.** (2011). Study of hexavalent chromium reduction by three yeast isolates: Elaboration of a strategy of bioremediation. *European Journal of Water Quality*. 42: 25-34.

**Bourelle P. et Berthelin J.** (2008). Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. *Lavoisier Technology*. P: 440.

**Bruins M., Kapil M. et Oehme F.** (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45: 198-207.

### C

**Carrasco J., Armario P., Pajuelo E. et Burgos A.** (2005). Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the *Aznalcollar pyrite* mine. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 1131-1140.

**Castoldi A., Coccini T. et Manzo L.** (2003). Neurotoxic and molecular effects of methyl-mercury in humans. *Environmental Health Perspectives*. 18: 19-31.

**Chang J.** (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*. 31: 1651-1658.

**Choudhary S. et Sar P.** (2009). Characterization of a metal resistant *Pseudomonas sp.* isolated from uranium mine for its potential in heavy metal ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Cd}^{2+}$ ) sequestration. *Bioresource Technology*. 100: 2482-2492.

## Références bibliographiques

---

- Clarkson W. et Magos L.** (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews In Toxicology*. 36: 609-662.
- Coral M., Korkmaz H., Arikan B. et Coral G.** (2005). Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter spp.* isolated from Sofulu landfill, in Adana, Turkey. *Annals of Microbiology*. 55 (3): 175-179.
- Costa A.C.A. et Duta F.P.** (2001). Bioaccumulation of Copper, Zinc, Cadmium and Lead by *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtili*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32: 1-5.
- D**
- Dabonne S., Koffi B., Kouadio E., Koffi A., Due E. et Kouame L.** (2010). Traditional utensils: Potential sources of poisoning by heavy metals. *British Journal of Pharmacology*. 1: 90-92.
- Deepa K., Sathishkumar M., Binupriya A., Murugesan S., Swaminathan K. et Yun S.** (2006). Sorption of Cr (VI) from dilute solutions and wastewater by live and pretreated biomass of *Aspergillus flavus*. *Chemosphere*. 62: 833-840.
- Deng X. et Wang P.** (2012). Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. *Bioresource Technology*. 121: 342-347.
- F**
- Fisher N. et Frood D.** (1980). Heavy metals and marine diatoms influence of dissolved organic compounds on toxicity and selection for metal tolerance among four species. *Marine Biology*. 59(2): 85-93.
- Fornarini L., Colao F., Fantoni R., Lazic V. et Spizzicchino V.** (2005). Calibration analysis of bronze samples by nanosecond laser induced breakdown spectroscopy: A theoretical and experimental approach. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*. 60: 1186-1201.
- G**
- Gadd G.** (1992). Metals and microorganisms: a problem of definition. *FEMS Microbiology Letters*. 79: 197-203.
- Gadd G. et Smith W.** (2000). Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 983 - 991.
- Jiang C., Sheng X., Qian M. et Wang Q.** (2008). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia sp.* from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*. 72: 157-164.

## Références bibliographiques

---

**Guiné V., Špadini L., Sarret G., Muris M., Delolme C., Gaudet J. et Martins J.** (2006). Zinc Sorption to Three Gram-Negative Bacteria: Combined Titration, Modeling, and EXAFS Study. *International Publisher of Science Technology*. 40: 1806-1813.

**Gutiérrez J., González A., Díaz S. et Ortega R.** (2003). Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. *European Journal of Protistology*. 39: 461-467.

### H

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

**Halttunen T., Salminen S. et Tahvonen R.** (2007). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 114 (1): 30-35.

**Hany H.** (2004). Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*. 0717-3458.

**Hao Z., Chen S. et Wilson D.** (1999). Cloning, expression, and characterization of cadmium and manganese uptake genes from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental*. 65: 4746-4752.

**Hazrat A., Ezzat K. et Sajad M.** (2013). Phytoremediation of heavy metals Concepts and applications. *Chemosphere*. 91: 869-881.

**Hideki K., Yui S., Fumika O., Mitsuharu I., Yasushi K., Haruki K., Tadao S. et Kazuhiko K.** (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology*. 164: 70-709.

**Hobman J., Yamamoto K. et Oshima T.** (2007). Transcriptomic Responses of Bacterial Cells to Sublethal Metal Ion Stress. *Microbiology Monographs*. 6 : 73-115.

### I

**Islam E., Yang E., He Z. et Mahmood Q.** (2007). Assessing potential dietary toxicity of heavy metals in selected vegetables and food crops. *Journal Zhejiang University Sciences*. 8: 1-13.

### J

**Jiang C., Sheng X., Qian M. et Wang Q.** (2008). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*. 72: 157-164.



## Références bibliographiques

---

### K

**Kaimoussi A., Mouzdahir A. et Saih A.** (2005). Seasonal Variations of Metal Concentrations (Cd, Cu, Fe, Mn and Zn) in Algae *Fucus spiralis* from the Coast of El Jadida City (Morocco). *Water Quality Research Journal of Canada*. 40: 102-110.

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

### L

**Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M.** (2005). Sélection De Souches De Bactéries Lactiques Antibactériennes. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*. 144: 237-250.

**Ledin M.** (2000). Accumulation of metals by micro-organisms processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*. 51:1-31.

**Legret M., Divet L. et Juste C.** (1988). Movement and speciation of heavy metals in a soil amended with sewage sludge containing large amount of Cd and Ni. *Water Research*. 22: 953-959.

**Lidsky T. et Schneider J.** (2003). Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*. 126: 5-19.

### M

**Malik A.** (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*. 30: 261-278.

**Martin T.A. et Ruby M.V.** (2004). Review of *in situ* remediation technologies for lead, zinc, and cadmium in soil. *Remediation*. 14: 35-53.

**Martin H., Young R., Kaplan I., Simon L. et Adriano C.** (1996). Evaluation of three herbaceous index plant species for bioavailability of soil cadmium, chromium, nickel and vanadium. *Plant and Soil*. 182: 199-207.

**Mclean R., Beauchemin D. et Beveridge T.** (1992). Influence of oxidation-state on ironbinding by *Bacillus licheniformis* capsule. *Applied Environmental Microbiology*. 55: 3143.

**Mergeay M., Nies D., Schlegel H., Charles P. et Gerits J.** (1987). *A. eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metal. *Journal of Bacteriology*. 162: 328-334.

**Mergler D., Anderson H., Chan L., Mahaffey K., Murray M., Sakamoto M. et Stern A.** (2007). The panel on health risks and toxicological effects of methylmercury. *A Journal of the Human Environment*. 36: 3-11.

## Références bibliographiques

---

### N

**Nies D.** (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology Biotechnol.* 51: 730-750.

**Nies D.** (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews.* 27: 313-339.

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

### O

**Oger J. et Freedman M.** (1999). Consensus Statement of the Canadian MS Clinics Network on: The Use of Disease Modifying Agents in Multiple Sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences.* 26: 4.

### P

**Pagès D., Sanchez L., Conrod S., Gidrol X., Fekete A., Schmitt-Kopplin P., Heulin T. et Achouak W.** (2007). Exploration of intracolonial adaptation mechanisms of *Pseudomonas brassicacearum* facing cadmium toxicity. *Environmental Microbiology.* 9: 2820- 2835.

**Paul A.** (2008). Microbial extracellular polymeric substances: central elements in Heavy metal bioremediation. *Indian Journal of Microbiology.* 48: 49-64.

**Pawlik-Skowron'ska B.** (2001). Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicology.* 52: 241-249.

**Piotrowska-Seget Z., Cycoń J. et Kozdró J.** (2005). Metal-tolerant Bacteria Occurring in Heavily Polluted Soil and Mine Spoil. *Applied Soil Ecology – Journal.* 28: 237-246.

### R

**Rainbow P. et Dallinger R.** (1993). Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. *Journal of metals in invertebrates.* 119-131.

**Ramade F.** (1992). *Précis d'Ecotoxicologie.* Paris : Masson. P: 177.

**Regine H. Vieira S. et Volesky B.** (2000). Biosorption: a solution to pollution. *International Microbiol.* 3:17-24.

**Ruiz-Fernández A., Frignani M., Hillaire-Marcel C., Ghaleb B., Arvizu M., Raygoza-Viera J. et Páez-Osuna F.** (2009) .Trace Metals (Cd, Cu, Hg, and Pb) Accumulation Recorded in the Intertidal Mudflat Sediments of Three Coastal Lagoons in the Gulf of California, Mexico. *Estuaries and Coasts.* 32: 551-564.

## Références bibliographiques

---

### S

- Sarret G., Avoscan L., Carriere M., Collins R., Geoffroy N., Carrot F., Coves J. et Gouget B.** (2005). Chemical Forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 Exposed to Selenite and Selenate. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 2331-2337.
- Sheng X., Xia J., Jiang C., He L. et Qian M.** (2008). Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*. 156: 1164-1170.
- Silver S. et Phung T.** (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32: 587-605.
- Siripornadulsil S. et Siripornadulsil W.** (2013). Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: Potential for microbial bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 94: 94-103.
- Sisca O., Novie F., Felycia E., Sunarsob J. et Suryadi I.** (2009). Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and waste water. *Biochemical Engineering Journal*. 44:19-41.
- Srinath T., Verma T., Ramteke P. et Garg S.** (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*. 48: 427-435.
- ### T
- Teemu H., Mattias F. et Seppo S.** (2007). Arsenic removal by native and chemically modified lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 173-178.
- Teemu H., Seppo S., Jussi M., Raija T. et Kalle L.** (2008). Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and *Bifidobacteria*. *International Journal of Food Microbiology*. 125: 170-175.
- Tornabene T. et Edwards H.** (1972). Microbial uptake of lead. *Science*. 176: 1334 -1335.
- ### V
- Vijayaraghavan K. et Yeoung-Sang Y.** (2007). Utilization of fermentation waste (*Corynebacterium glutamicum*) for biosorption of Reactive Black 5 from aqueous solution. *Journal of Hazardous Material*. 141: 45-52.
- Volesky B.** (1986). "Biosorbent Materials". *Biotechnology And Bioengineering*. 16: 121-126.
- Volesky B.** (1990). Biosorption and biosorbents In: *Biosorption of heavy metals*. Boston, USA, CRC press. P: 3-5.

**Volesky B.** (2001). Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*. 59: 203-16.

**Vos P.D., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. et Whitman W.B.** (2009). *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. 2<sup>ème</sup> Edition. Volume (3): 1984-1989.

### W

**Wei G., Fan L., Zhu W., Fu Y., Yu J. et Tang M.** (2009). Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials*. 162: 50-56.

**Worms I., Simon D., Hassler C. et Wilkinson K.** (2006). Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on bio-uptake. *Biochimie*. 88: 1721-1731.

**Wright D. et Welbourn P.** (2002). *Environmental Toxicology*. Cambridge University Press. Pp: 274-280.

**Wu C.H., Wood T.K. et Mulchandani A.** (2006). Engineering Plant-Microbe Symbiosis for Rhizoremediation of Heavy Metals. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (2): 1129.

**Wuana R. et Okieimen F.** (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology*. 1- 20.

### X

**Xiao-bing J., Nan H., Ying Z., Yan-ru C. et Heng X.** (2012). Isolation and characterization of heavy-metal mobilizing bacteria from contaminated soils and their potential in promoting Pb, Cu, and Cd accumulation by *Coprinus comatus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 58: 45-53.

### Y

**Yadav S.** (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*. 76: 167-179.

### Z

**Zakhama S., Dhaouadi H. et M'Henni F.** (2011). Non linear modelisation of heavy metal removal from aqueous solution using *Ulva lactuca* algae. *Bioresource Technology*. 102: 786-796.

## Annexes

**Annexe 1:** Evolution des souches bactériennes de l'environnement (E1-E5) dans le bouillon nutritif additionné d'une concentration de 40mg/ l de Cr<sup>6+</sup>.

Isolats	T=0 h	T=9h	T=33	T=48h
E1	0,083	0,15	0,263	0,144
E2	0,08	0,099	0,329	0,119
E3	0,083	0,081	0,081	0,072
E4	0,081	0,2	0,226	0,351
E5	0,09	0,166	0,084	0,276

**Annexe 2:** Evolution des souches bactériennes de l'environnement (E1-E5) dans le bouillon nutritif additionné d'une concentration de 100 ppm de (Pb).

isolats	T=0 h	T=9h	T=33h	T=48h
E1	0,046	0,166	0,588	0,84
E2	0,073	0,14	0,321	0,218
E3	0,075	0,212	0,311	0,333
E4	0,068	0,297	0,663	0,646
E5	0,076	0,15	0,188	0,133

**Annexe 3:** Evolution des souches bactériennes lactiques (Stsa, L5, J14, S3 et 15) dans le bouillon MRS additionner d'une concentration de 40mg/ l de (Cr<sup>6+</sup>).

isolats	T=0 h	T=12 h	T=48 h
Stsa	0,022	0,922	1,657
L5	0,015	0,205	1,23
J14	0,025	0,376	1,202
S3	0,023	0,98	1,503
15	0,02	0,458	1,596

## Annexes

**Annexe 4:** Evolution des souches bactériennes lactiques (Stsa, L5, J14, S3 et 15) dans le bouillon MRS additionné d'une concentration de 100 ppm de (Pb).

isolats	T=0 h	T=12 h	T=24 h	T=36 h	T=48 h
Stsa	0,281	1,872	2,335	2,577	3,555
L5	0,3	0,411	2,012	2,292	2,966
J14	0,31	1,919	2,377	2,287	2,589
S3	0,302	0,46	2,045	1,822	2,847
15	0,27	0,401	2,3	2,894	3,678

**Annexe 5:** Evolution de la souche bactérienne(E1) dans le bouillon nutritif en absence et en présence de (Pb) à une concentration de 100 ppm.

souches	t=0h	t=24h	t=48h
E1	0,23	0,569	0,4
E1+ Pb	0,229	0,291	0,198

**Annexe 6:** Evolution de la souche bactérienne (E4) dans le bouillon nutritif en absence et en présence de ( $Cr^{+6}$ ) à une concentration finale de 40 mg/l.

souches	t=0h	t=3h	t=9h	t=33h	t=48h
E4	0,029	0,305	0,521	0,558	0,492
E4+ Cr	0,031	0,181	0,22	0,358	0,298

**Annexe 7:** Evolution de la souche bactérienne (Stsa) dans le bouillon MRS en absence et en présence de ( $Cr^{+6}$ ) à une concentration finale de 40 mg/l.

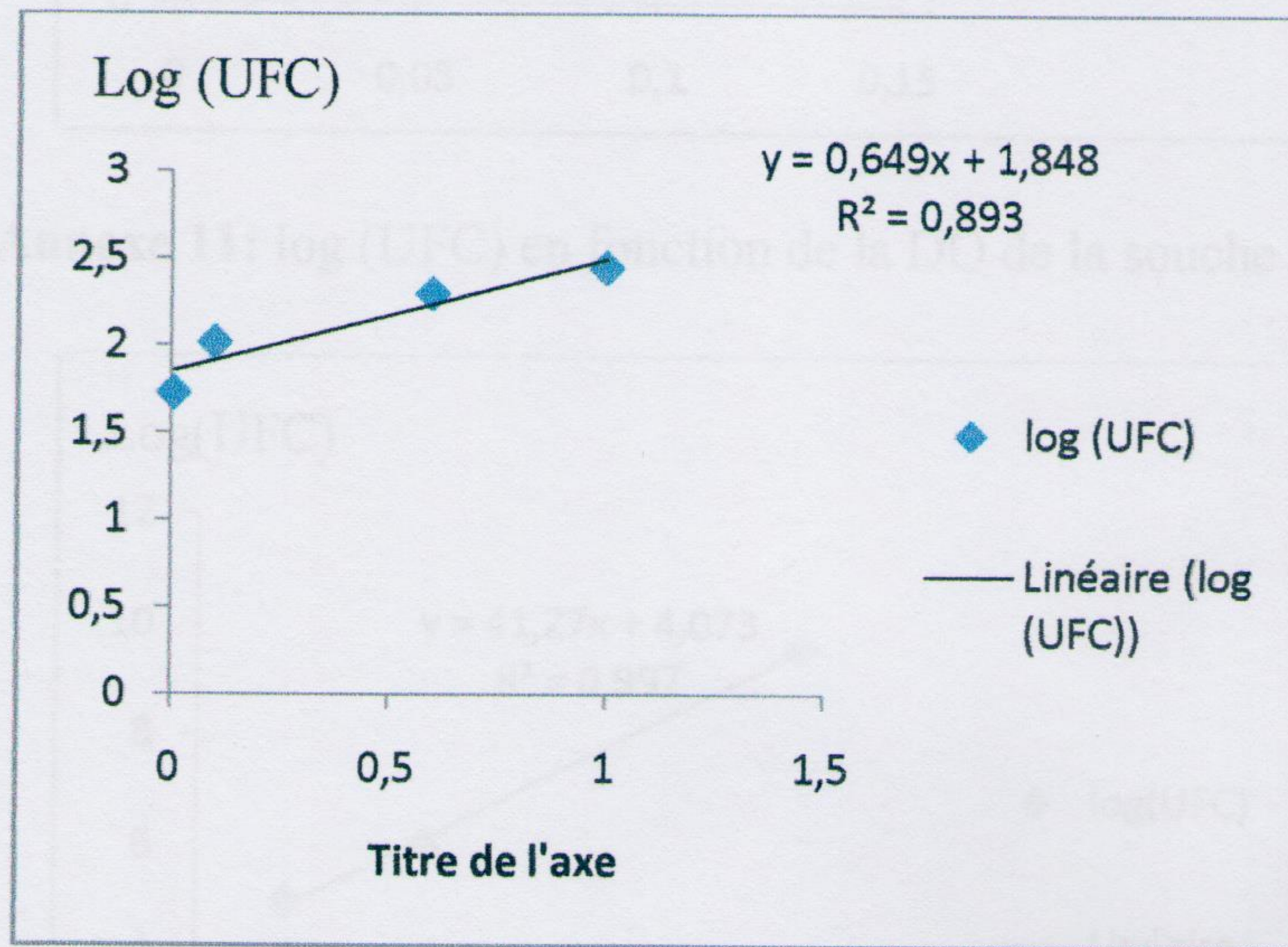
souches	t=0h	t=3h	t=6h	t=9h	t=24h	t=33h	t=48h
Stsa	0,123	0,269	0,969	1,107	1,059	1,042	1
Stsa+ Cr	0,12	0,27	0,973	1,046	0,971	0,962	0,934

Annexe 11: log (UFC) en fonction de la DO de la souche E1.

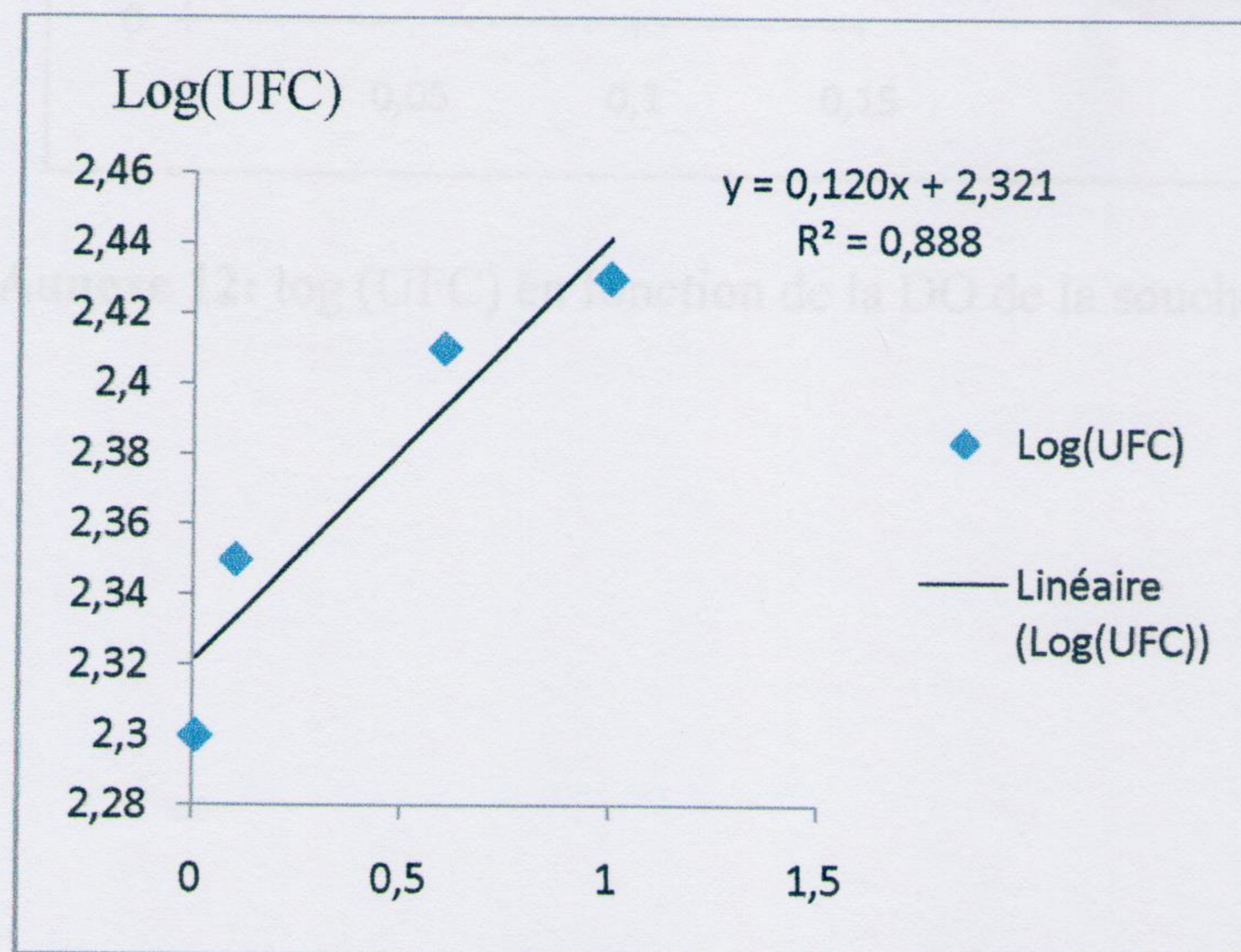
## Annexes

**Annexe 8:** Evolution de la souche bactérienne (15) dans le bouillon MRS en absence et en présence de (Pb) à une concentration de 100 ppm.

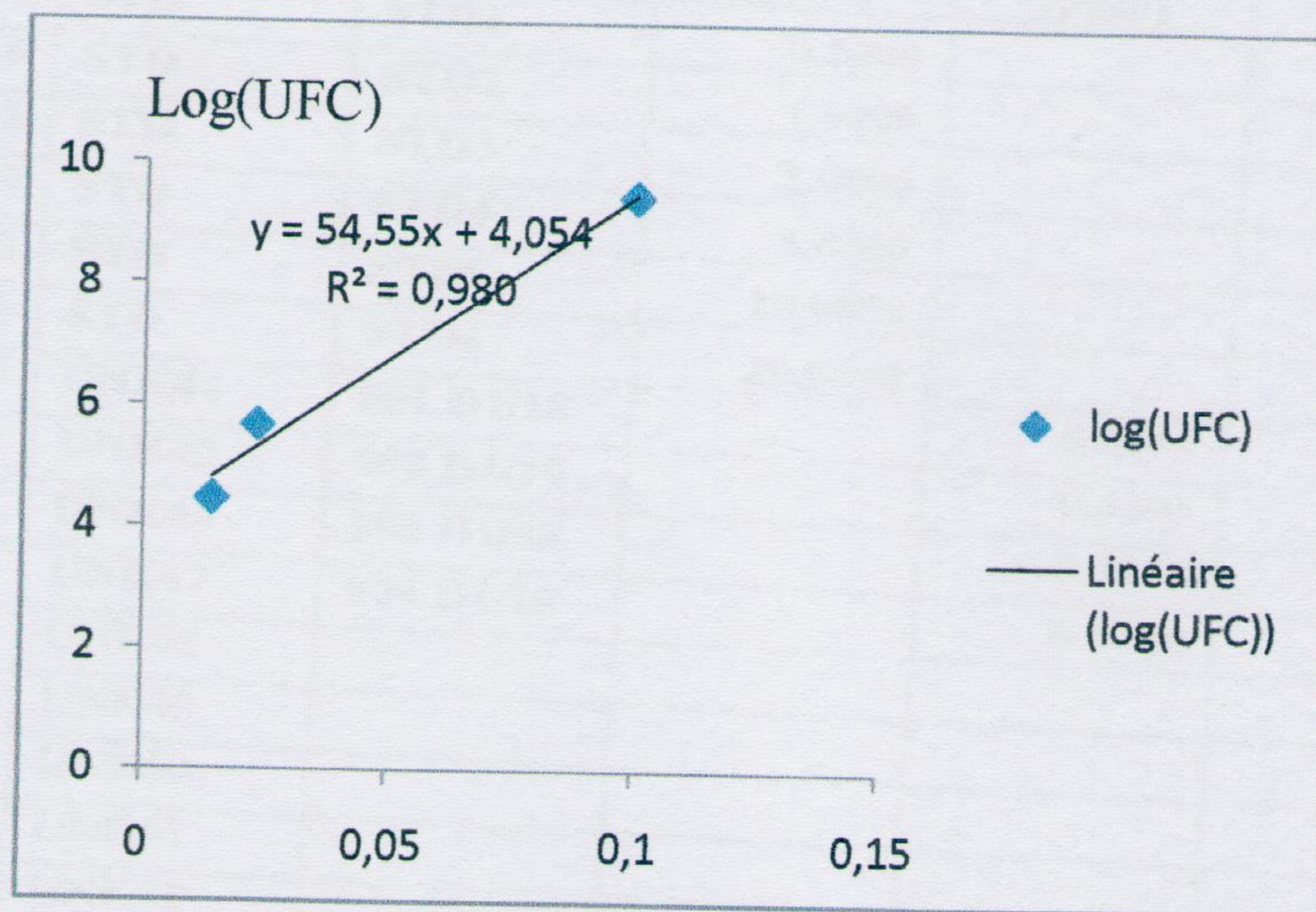
souches	t=0h	t=3h	t=6h	t=9h	t=24h	t=48h
15	0,135	0,239	1,089	1,155	1,086	1
15+ Pb	0,137	0,212	0,946	1,057	0,908	0,923



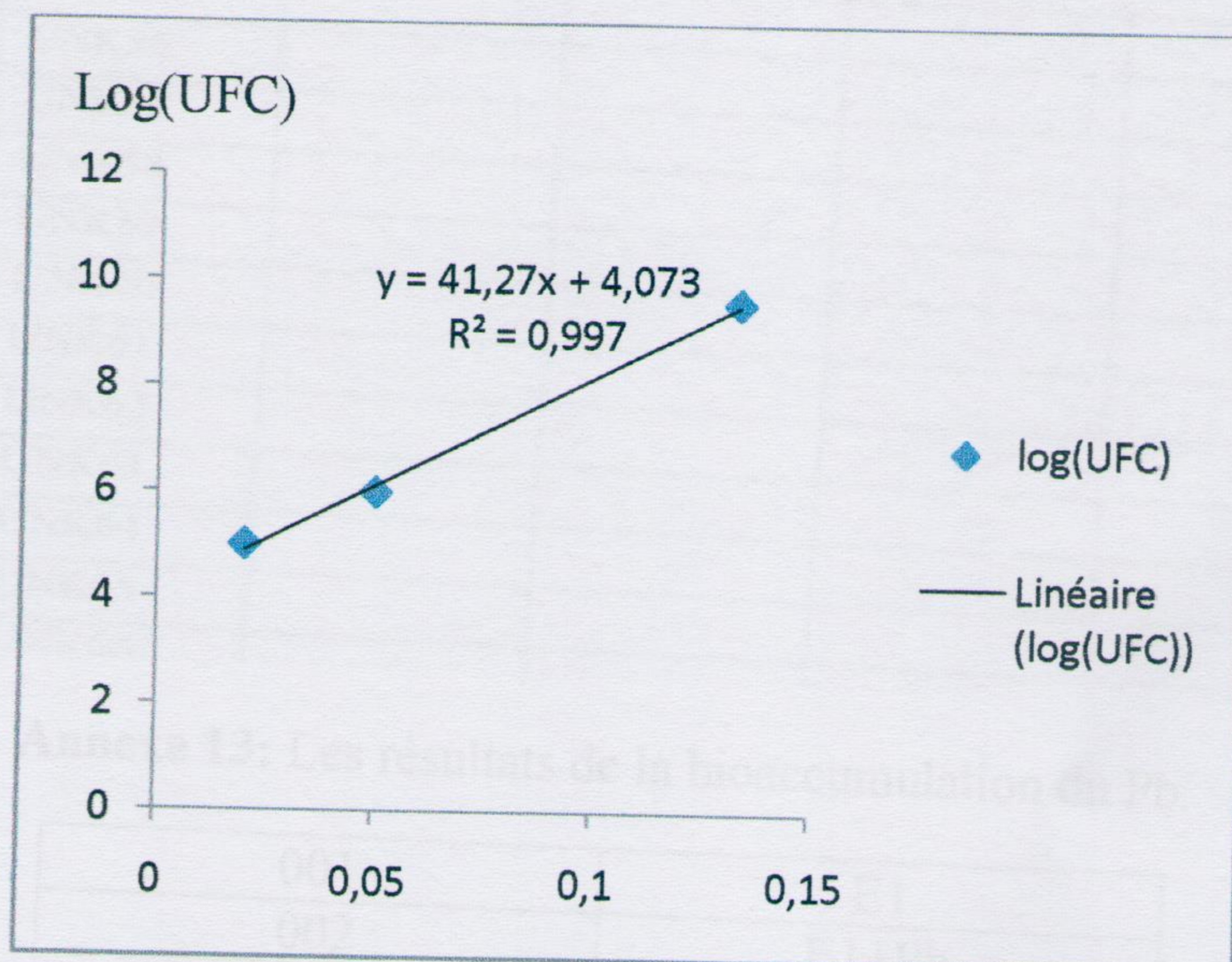
**Annexe 9:** log (UFC) en fonction de la DO de la souche E4.



**Annexe 10:** log (UFC) en fonction de la DO de la souche E1.



Annexe 11: log (UFC) en fonction de la DO de la souche Stsa.



Annexe 12: log (UFC) en fonction de la DO de la souche 15.



	Action	Sample ID	True Value (ppm)	Conc. (ppm)	Abs.
4	STD	STD1			
6	STD	STD2	0.5000		0.0032
8	STD	STD3	1.0000		0.0057
9	STD	STD4	2.0000		0.0174
10	STD	STD5	5.0000		0.0446
11	STD	STD6	10.0000		0.0898
59	UNK44	001 D1/10	20.0000		0.1754
60	UNK45	002 D1/10		0.0499	0.0044
61	UNK46	003 D1/10		6.4364	0.0567
62	UNK47	004 D1/10		0.0383	0.0029
63	UNK48			6.8224	0.0601
64	UNK49				
65	UNK50				
66	UNK51				
67	UNK52				
68	UNK53				
69	UNK54				
70	UNK55				
71	UNK56				
72	UNK57				
73	UNK58				
74	UNK59				
75	UNK60				
76	UNK61				
77	UNK62				
78	UNK63				
79	UNK64				
80	UNK65				
81	UNK66				

**Annexe 13:** Les résultats de la bioaccumulation du Pb.

001	E1
002	E1+Pb
003	15
004	15+Pb

**Annexe 14 :** la représentation des souches

Annexe 15: la représentation des souches

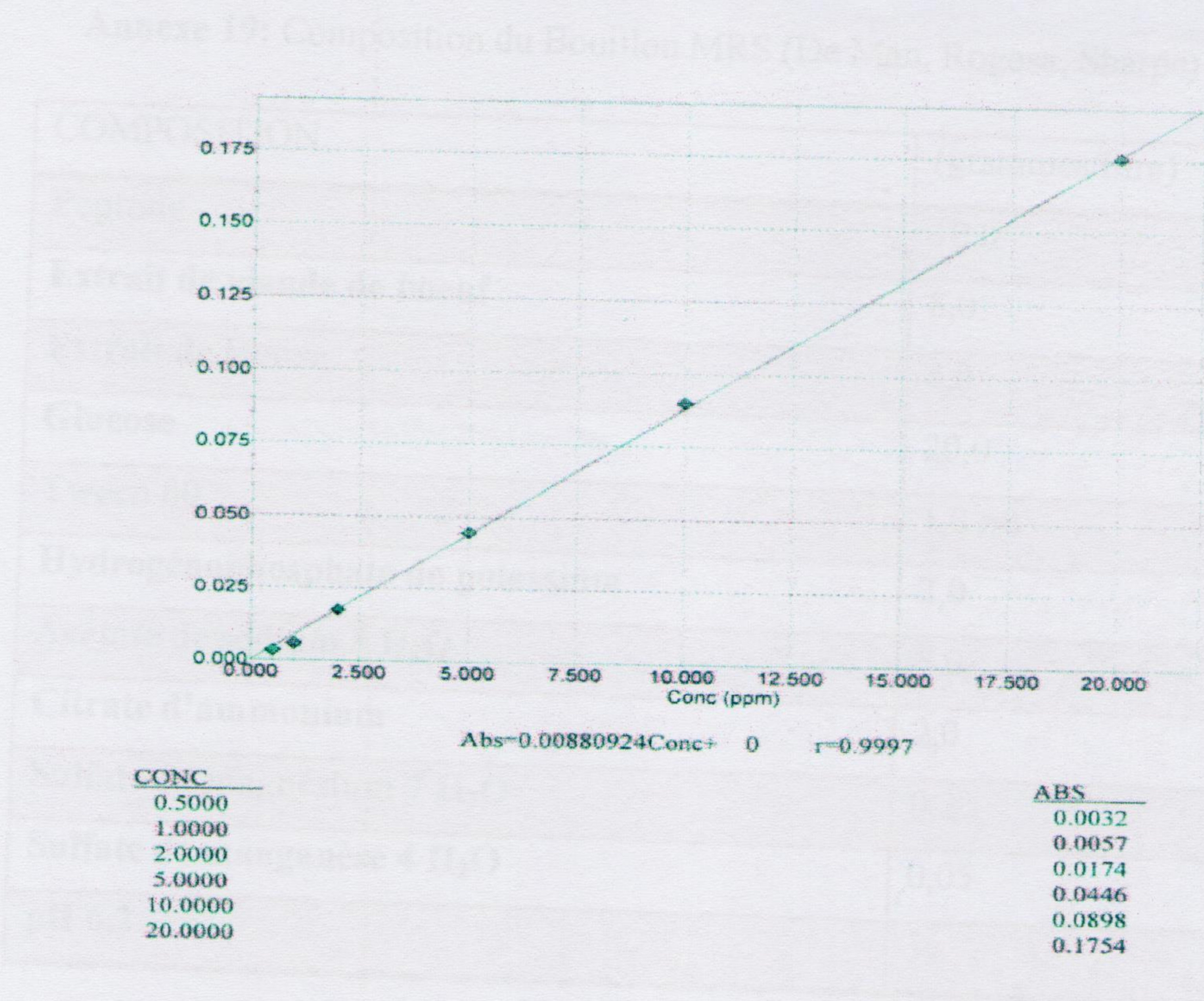
	Action	Sample ID	True Value (ppm)	Conc. (ppm)	Abs.
7	STD	STD1	0.2000		0.0019
8	STD	STD2	0.5000		0.0072
9	STD	STD3	1.0000		0.0130
10	STD	STD4	2.0000		0.0287
11	STD	STD5	5.0000		0.0713
22	UNK4	001		0.0703	0.0010
23	UNK5	002 D1/10		0.0914	0.0013
25	UNK7	003		0.0281	0.0004
26	UNK8	004 D1/10		0.0914	0.0013
27	UNK9				
28	UNK10				
29	UNK11				
30	UNK12				
31	UNK13				
32	UNK14				
33	UNK15				
34	UNK16				
35	UNK17				
36	UNK18				
37	UNK19				
38	UNK20				
39	UNK21				
40	UNK22				
41	UNK23				

**Annexe 15:** Les résultats de la bioaccumulation de Cr.

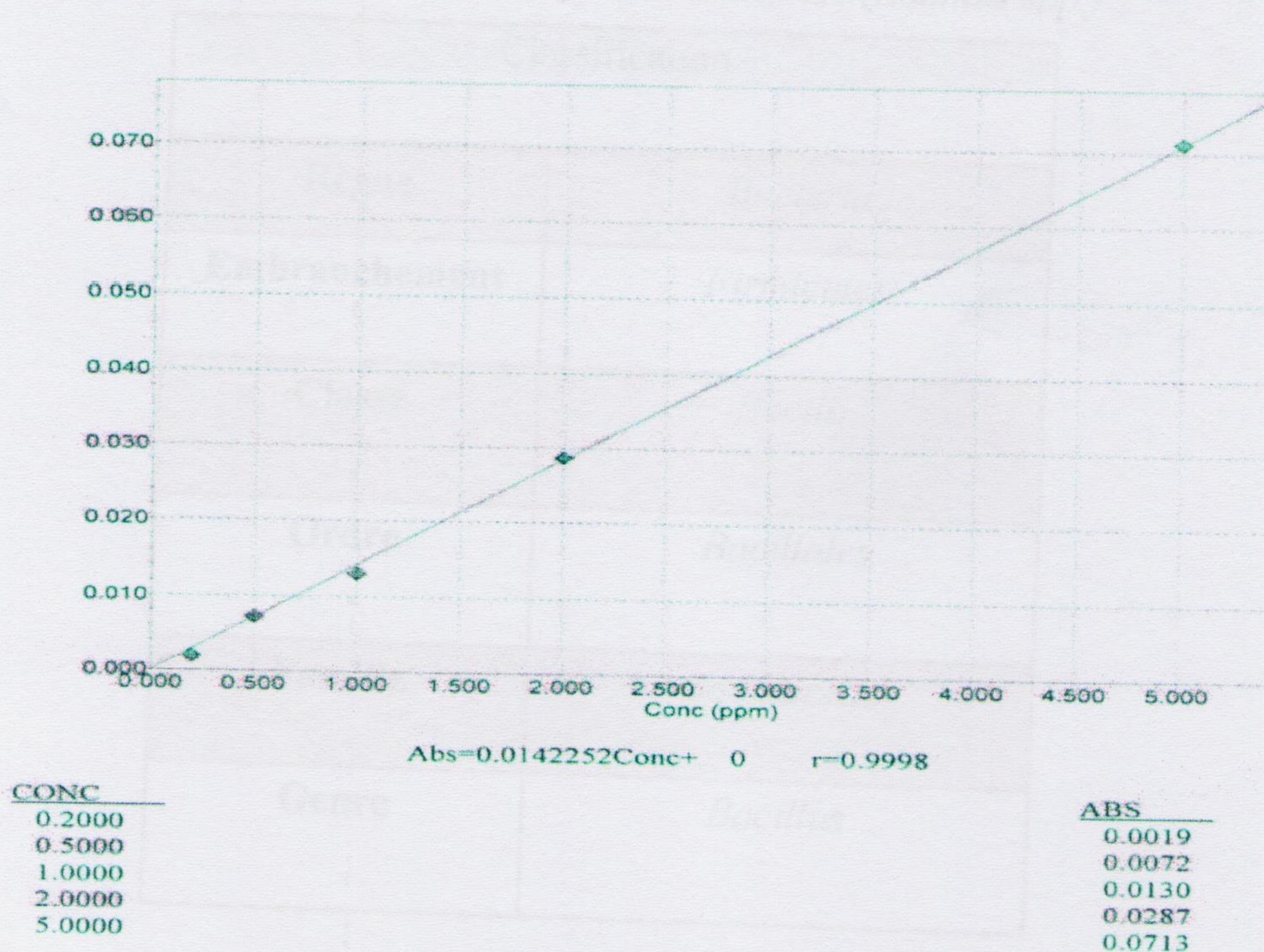
001	E4
002	E4+Cr
003	Stsa
004	Stsa+Cr

**Annexe 16:** la représentation des souches

**Annexe 18:** Courbe d'étalonnage pour le dosage du Cr par la SAA (flame Cr-D1)



Annexe 17: Courbe d'étalonnage pour le dosage du Pb par la SAA (flame C# :01)



Annexe 18: Courbe d'étalonnage pour le dosage du Cr par la SAA (flame C# :01)

Annexe 19: Composition du Bouillon MRS (De Man, Rogosa, Sharpe)

COMPOSITION	
	(grammes/litre)
Peptone	10,0
Extrait de viande de boeuf	8,0
Extrait de levure	4,0
Glucose	20,0
Tween 80	1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2,0
Acétate de sodium 3 H <sub>2</sub> O	5,0
Citrate d'ammonium	2,0
Sulfate de magnésium 7 H <sub>2</sub> O	0,2
Sulfate de manganèse 4 H <sub>2</sub> O	0,05
pH 6,2	

Annexe 20 : Classification de la souche E4 (*Bacillus spp.*)

Classification	
Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>
Genre	<i>Bacillus</i>

Annexe 21 :Classification de la souche E1 (*Rhodococcus spp.*)

Classification	
<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Embranchement</b>	Actinobacteria
<b>Classe</b>	Actinomycetales
<b>Ordre</b>	Corynebacterineae
<b>Famille</b>	Nocardiaceae
<b>Genre</b>	<i>Rhodococcus</i>



Annexe 21 :Classification de la souche E1 (*Rhodococcus spp.*)

Classification	
<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Embranchement</b>	Actinobacteria
<b>Classe</b>	Actinomycetales
<b>Ordre</b>	Corynebacterineae
<b>Famille</b>	Nocardiaceae
<b>Genre</b>	<i>Rhodococcus</i>



Présenté par :  
FenekWarda  
MimouneAhlem

Président : Mr. Laib Essaid  
Examinatrice : M<sup>elle</sup> Amira Samiya  
Encadreur: Dr. Ouled Haddar Houria

## Etude de la Bioaccumulation de Chrome et de Plomb Par Quelques Bactéries d'Origines Différentes

### Résumé

Des centaines de polluants sont rejetés chaque jour dans l'environnement. Parmi eux, les métaux lourds sont considérés comme des polluants de grave incidence sur l'environnement à cause de leur persistance et leur tendance à s'accumuler dans les organismes vivants.

Les bactéries sont caractérisées par leur pouvoir de détoxifier ces métaux lourds par divers processus tels que la bioaccumulation. Le but de ce travail est l'étude du processus de la bioaccumulation des deux métaux (chrome et plomb) par les bactéries de l'environnement et les BL, dix souches bactériennes ont été testées pour leur capacité à résister le chrome ou le plomb, alors que seulement deux souches ont été identifiées partiellement (*Bacillus ssp.* et *Rhodococcus ssp.*), et deux souches lactiques ont été identifiées précédemment, et étudiées pour leur pouvoir de bioaccumulation, les résultats révèlent que les souches bactériennes accumulent une concentration de 64.24ppm du plomb et 9.14 ppm du chrome pour les souches *Bacillus*, *Streptococcus* et *Rhodococcus*, *Lactobacillus*.

**Mots clés :** bactérie, métaux lourds, bioaccumulation, toxique.

### Abstract

Hundreds of pollutants are released into the environment each day. Among them, the heavy metals are considered as serious environmental pollutants due to their persistence and tendency to accumulate in living organisms.

Bacteria are characterized by their ability to detoxify heavy metals by various processes such as bioaccumulation. The aim of this work is the study of the process of bioaccumulation of both metals (chromium and lead) by bacteria in the environment and LAB, ten bacterial strains were tested for their ability to resist chromium or lead, while tow strains were partially identified (*Bacillus ssp.* and *Rhodococcus ssp.*), and tow LAB strains have been identified previously and have been studied for ability to bioaccumulate the metals, the results indicated that the bacterial strains accumulate a concentration of 64.24ppm of lead and 9.14ppm of chromium, for the strains *Bacillus*, *Streptococcus* and *Rhodococcus*, *Lactobacillus*.

**Keywords:** bacteria, heavy metals, bioaccumulation, toxic.

### المخلص

يتم رمي المئات من الملوثات في البيئة كل يوم. من بينها، المعادن الثقيلة والتي تعتبر من الملوثات البيئية الخطيرة بسبب سرعة انتشارها وقدرتها على التراكم الحيوي في الكائنات الحية.

تميز البكتيريا بقدرتها على نزع سمية المعادن الثقيلة من خلال عدة طرق من بينها التراكم الخلوي. الهدف من هذا العمل هو دراسة عملية تراكم لمعدنين (الكروم والرصاص) من قبل بكتيريا البيئة و البكتيريا اللبنية، تم اختبار عشر سلالات بكتيرية لقدرتها على مقاومة الكروم أو الرصاص، في حين تم التشخيص الجزئي لسلالتي (*Bacillus ssp.* et *Rhodococcus ssp.*)، و سلالتان لبنيتين تم تحديدهما من قبل. وتمت دراستهم قدرتهم على التكدس الخلوي، النتائج أظهرت أن هذه السلالات البكتيرية تكدس تركيزا 64.24 جزء بالمليون من الرصاص و 9.14 جزء بالمليون من الكروم بالنسبة للعزلات *Bacillus*, *Streptococcus* و *Rhodococcus*, *Lactobacillus*.

كلمات الرئيسية: البكتيريا، المعادن الثقيلة، التكدس الخلوي، السمية.