

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



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

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم: الميكروبيولوجيا التطبيقية  
وعلوم التغذية

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme :

**Master Académique en Biologie**

**Option : Microbiologie Appliquée**

### Thème

**Evaluation de la capacité de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) à accumuler certains métaux lourds**

#### Membres de Jury

Président : Mr. Laib Essaid

Examinatrice : M<sup>me</sup>. Bourzama Ghania

Encadreur : Dr. Ouled Haddar Houria

#### Présenté par :

Boubata Narimène

Brahimi Besma

Année Universitaire 2014 - 2015

Numéro d'ordre (bibliothèque):.....

Sommaire .....	I
Liste des figures .....	III
Liste des tableaux .....	IV
Liste des abréviations .....	V
Introduction .....	1
Partie bibliographique	
I. Les métaux lourds dans l'environnement.....	3
II. Les sources de métaux lourds dans l'environnement .....	3
II.1. Source naturelle .....	3
II.2. Source anthropique.....	3
III. Importance biologique.....	4
IV. Toxicité des métaux lourds.....	4
IV.1. Effet des métaux lourds sur le sol et l'eau .....	5
IV.2. Effet des métaux lourds sur les microorganismes .....	5
IV.3. Effet des métaux lourds sur l'Homme .....	6
V. Elimination des métaux lourds.....	7
V.1. Les techniques physicochimiques.....	7
V.2. Les techniques biologiques.....	8
V.2.1. Bioremediation par phytoremediation .....	8
V.2.2. Bioremediation par biosorption .....	8
V.2.3. Bioremediation par bioaccumulation .....	9
V.3. Les types de biosorbants .....	10
V.4. Les interactions entre bactéries et métaux lourds .....	10
V.5. Interactions des EPS bactériens avec les métaux lourds .....	11
VI. Les mécanismes de résistance aux métaux lourds.....	12
VII. Applications des biofilms dans la bioremediation.....	13
Matériel et méthodes	
I. Matériel.....	14
I.1. Les souches bactériennes .....	14
I.2. Les milieux de culture .....	14
I.3. Appareillage .....	14
I.4. Produits chimiques et réactifs .....	15
I.5. Disques d'antibiotiques .....	15

II. Méthodes.....	15
II.1. Revivification des souches .....	15
II.2. Préparation des solutions mères de métaux lourds .....	16
II.3. Screening des métaux lourds tolérés par les souches bactériennes .....	16
II.4. Calcul du taux de croissance .....	17
II.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice .....	17
II.6. Détermination de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques .....	17
II.7. Effet des métaux lourds sur la croissance des souches .....	18
II.8. Bioaccumulation de Pb et Hg par les souches bactériennes .....	18
II.8.1. Bioaccumulation de plomb.....	18
II.8.2. Lyse cellulaire .....	19
Résultats et discussions	
I. Screening des métaux lourds tolérés par les souches bactériennes .....	20
II. La concentration minimale inhibitrice .....	23
III. Effet des métaux lourds sur la croissance des souches .....	25
IV. Détermination de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques .....	27
V. Test de bioaccumulation du Pb .....	29
Conclusion .....	33
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

<b>Fig.1.</b> Schéma des interactions entre métaux et microorganismes.....	11
<b>Fig.2.</b> Représentation schématique du transport et des mécanismes de résistance au mercure chez les bactéries .....	12
<b>Fig.3.</b> Cinétique de croissance de <i>Pseudomonas sp</i> (S4) dans le bouillon nutritif additionné de 1mg/l du Fe, Pb, Hg et Cr .....	20
<b>Fig.4.</b> Cinétique de croissance de <i>Bacillus megaterium</i> dans le bouillon nutritif additionné de 1mg/l du Fe, Pb, Hg et Cr .....	20
<b>Fig.5.</b> Cinétique de croissance de <i>Bacillus megaterium</i> dans le bouillon nutritif additionné de 10 mg/l du Fe, Pb, Hg et Cr .....	21
<b>Fig.6.</b> Cinétique de croissance de <i>Pseudomonas sp</i> (S4) dans le bouillon nutritif additionné de 10 mg/l du Fe, Pb, Hg et Cr .....	21
<b>Fig.7.</b> Cinétique de croissance de <i>Pseudomonas sp</i> (S4) dans le bouillon nutritif en présence et en absence du Hg à 30 mg/l et l'évolution du pH .....	26
<b>Fig.8.</b> Cinétique de croissance de <i>Bacillus megaterium</i> dans le bouillon nutritif en présence et en absence du Pb à 200 mg/l et l'évolution du pH .....	26
<b>Fig.9.</b> photographie représentant les résultats de l'antibiogramme sur <i>Bacillus megaterium</i> ....	27
<b>Fig.10.</b> photographie représentant les résultats de l'antibiogramme sur <i>Peudomonas sp</i> (S4) ..	28
<b>Fig. 11.</b> L'évolution de la concentration du Pb extracellulaire en fonction du temps .....	29
<b>Fig. 12.</b> Bioaccumulation du plomb par <i>Bacillus megaterium</i> .....	30

<b>Tableau 1.</b> Les sources anthropiques des métaux lourds spécifiques dans l'environnement .....	4
<b>Tableau 2.</b> Effets nocifs des métaux lourds spécifiques sur la santé humaine.....	6
<b>Tableau 3.</b> Comparaison entre les caractéristiques des processus de biosorption et de bioaccumulation des métaux lourds .....	9
<b>Tableau 4.</b> Le taux de croissance des deux souches dans le milieu contenant le métal à 1 mg/l .....	21
<b>Tableau 5.</b> Le taux de croissance des deux souches dans le milieu contenant le métal à 10 mg/l .....	22
<b>Tableau 6.</b> La cinétique de la croissance de <i>Bacillus megaterium</i> à différentes concentrations du Plomb .....	23
<b>Tableau 7.</b> La cinétique de la croissance de <i>Pseudomonas</i> (S4) à différentes concentrations du mercure .....	23
<b>Tableau 8.</b> Le taux de croissance des deux souches en présence et en absence du métal .....	27
<b>Tableau 9.</b> La résistance et la sensibilité de <i>Bacillus megaterium</i> aux antibiotiques .....	28
<b>Tableau 10.</b> La résistance et la sensibilité de <i>Pseudomonas</i> (S4) aux antibiotiques .....	29
<b>Tableau 11.</b> La concentration intracellulaire du plomb .....	30

## Liste des abréviations

---

AM	Ampicilline
AML	Amoxicilline
As	Arsenic
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
BN	Bouillon nutritive
Cd <sup>2+</sup>	Cadmium divalent
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CT	Colistinsulphate
DO	Densité Optique
EDS	Spectroscopie à Rayons X à Dispersion d'énergie
EPS	Exopolysaccharides
ERY	Erytromycine
GEN	Gentamicine
GN	Gélose nutritive
Hg <sup>0+</sup>	Mercure élémentaire
P	Penicilline G
Pb	Plomb
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Sel de nitrate de plomb
ppm	Partie Par Million
RND	Resistance au Nodulation de Division Cellulaire
ROS	Reactive Oxygen Species
SAA	Spectrophotométrie d'Absorption Atomique
S <sub>3</sub>	Compound sulphonamides
SEM	Microscopie Electronique à Balayage
SM	Solution Mere
SXT	Trimethoprim sulphamethoxazole
TET	Tetracycline
μ	Taux de croissance

# *Introduction*

Le problème de la pollution de l'environnement concerne le monde entier à cause de la prolifération des activités industrielles et l'utilisation intensive des produits chimiques ce qui a provoqué des problèmes majeurs pour la biosphère (Lyon et Vogel, 2013 ; Nagashetti et al., 2013 ; Siripornadulsil et Siripornadulsil, 2013).

Les métaux lourds (comme le cadmium, le cuivre, le nickel, et le zinc) existent naturellement dans les sols, les roches, l'eau, et les organismes à des concentrations faibles, en plus, les métaux lourds ont de nombreuses applications industrielles en raison de leur importance technologique (Nourbakhsh et al., 2002 ; Kang et al., 2013).

Au cours des dernières années, la pollution par les métaux lourds est devenue l'un des plus graves problèmes environnementaux à cause de nombreuses industries (L'industrie pétrolière des carburants, de l'énergie, des engrais, des pesticides, la métallurgie, la sidérurgie, et celle du cuir) (Pazirandeh et al., 1998 ; Das et al., 2008). En effet, certains métaux lourds sont nutritifs à faible concentrations, toutefois, à des concentrations élevées ils deviennent toxiques (Xu et al., 2010). Ces éléments peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des chaînes trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (Ali et al., 2013).

Les méthodes d'élimination des métaux lourds de l'environnement peuvent être divisées en deux groupes: les méthodes biotiques telles que la biosorption / bioaccumulation, qui sont basées sur l'accumulation des métaux par les plantes ou les microorganismes et les méthodes abiotiques qui sont basées sur l'élimination physicochimique (Gabr et al., 2008 ; Velusamy et al., 2011).

Une gamme importante de technologies physico-chimiques est disponible pour décontaminer l'environnement, et comme la plupart des métaux lourds sont solubles dans l'eau et dans les milieux aquatiques ils sont donc difficiles à séparer par les techniques physiques. Ces traitements, souvent très coûteux, induisent d'importantes modifications des propriétés du milieu, et possèdent diverses limitations, ce qui a incité à développer des méthodes biologiques curatives (Hussein et al., 2004; Machado et al., 2010; Sen et al., 2013).

D'après plusieurs études, les approches biotechnologiques qui utilisent des micro-organismes comme les algues, les bactéries et les champignons sont très prometteuses (Chang et al., 1997). Les micro-organismes sont essentiels pour fertiliser les sols et dégrader les matières organiques et / ou polluants toxiques dans les sédiments et les sols. En raison de leurs fonctions écologiques pertinentes et ubiquitaires, ils peuvent être utilisés avec succès dans la remédiation biologique de la pollution (Díaz et al., 2006).



L'objectif du présent travail est d'étudier la capacité de deux cultures bactériennes de tolérer une variété de métaux lourds. Les deux bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* ont été préalablement isolées des boues activées connues pour être le siège de nombreuses activités métaboliques.

L'objectif s'étend à évaluer la capacité des deux souches à accumuler ou adsorber les métaux lourds dans le but d'une éventuelle application en bioremédiation.

# *Partie bibliographique*

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

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

Le terme «métaux lourds» est couramment utilisé pour décrire les métaux qui sont toxiques. D'après les chercheurs, il existe de nombreuses définitions des "métaux lourds" qui sont classés selon certaines propriétés physiques, chimiques ou biologiques, y compris la densité (poids spécifique), poids atomique. La majorité des définitions n'ont aucune relation avec la toxicité de ces métaux pour les organismes vivants (Chojnaka, 2007).

Selon la littérature scientifique courante, les métaux lourds sont définis comme des éléments métalliques qui ont une densité de 4 à 5 g / cm<sup>3</sup> et qui est relativement élevée par rapport à l'eau avec un poids atomique supérieur à 63,54 (Gadd, 1992 ; Nies, 1999 ; Tchounwou et al., 2012 ; Ogbonna et al., 2013).

## **II. Les sources de métaux lourds dans l'environnement**

Généralement les métaux lourds rejoignent l'environnement à partir de deux sources principales notamment la source naturelle et celle anthropique (Ali et al., 2013).

### **II.1. Source naturelle**

Les sources naturelles les plus importantes sont l'altération des minéraux originels du sol, l'érosion et l'activité volcanique. Toutefois, les activités humaines, telles que les activités industrielles, l'usage successif des produits chimiques en particulier dans l'agriculture, et l'élimination inappropriée des déchets sont considérés comme une source externe qui fournit plusieurs métaux lourds (Ali et al., 2013; Xu et al., 2014).

### **II.2. Source anthropiques**

Au cours des dernières décennies, la teneur en éléments inorganiques par apports anthropiques a dépassé celle apportée naturellement (Xu et al., 2014).

Les sources anthropiques sont diverses telles que l'exploitation minière, l'utilisation de pesticides et engrais, les boues résiduelles, les rejets industriels, ... etc. Le tableau 1 résume quelques sources anthropiques des métaux lourds (Wang et al., 2005; Wei et al., 2009; Ali et al., 2013).

**Tableau 1 :** Les sources anthropiques de quelques métaux lourds dans l'environnement (Ali et al., 2013).

Métaux lourds	Sources
As	Pesticides et conservation du bois
Cd	Peintures et pigments, galvanoplastie, incinération des plastiques contenant du cadmium, engrais phosphatés
Cr	Industrie du tannage, industrie de l'acier, cendres volatile
Cu	Pesticides, engrais
Hg	Exploitation minière et combustion du charbon, déchets médicaux
Ni	Effluents industriels, appareils de ménagers, instruments chirurgicaux
Pb	Émissions aérienne de la combustion de l'essence au plomb, fabrication des batteries, herbicides et insecticides

### III. Importance biologique

Du point de vue physiologique, les métaux lourds peuvent également être classés en oligo-éléments essentiels qui sont requis par les organismes en quantités non excessives pour assurer les fonctions physiologiques et biochimiques vitales, mais en excès ils deviennent toxiques par exemple : Fe, Cu, Zn, Ni, K, Ca, Co et non essentiels qui ne sont pas nécessaires pour les organismes vivants tels que : Cd, Pb, As, Hg, Cr... etc. (Valls et Lorenzo, 2002 ; Cloutier et al., 2009 ; Ali et al., 2013).

Les métaux lourds essentiels sont des co-facteurs importants de plusieurs enzymes clés et jouent des rôles importants dans diverses réactions d'oxydo-réduction (Tchounwou et al., 2012).

### IV. Toxicité des métaux lourds

Les métaux lourds sont l'un des polluants les plus persistants dans l'environnement, leur présence dans l'air, le sol et l'eau est connue comme une source de menace croissante pour l'environnement et la santé humaine (Nithya et al., 2011 ; Xu et al., 2014 ).

Contrairement aux polluants organiques, ils ne peuvent pas être dégradés mais s'accumulent tout au long de la chaîne trophique grâce aux activités industrielles et urbaines y compris les industries du charbon, du gaz naturel, et du papier (Oliveira et al., 2007 ; Nithya et al., 2011 ; Xu et al., 2014 ).

Les ions de métaux lourds peuvent avoir des effets toxiques sur les plantes, les animaux ou les humains, et leur toxicité est liée à leur mobilité dans le sol. Plus la mobilité est élevée, plus le risque de toxicité de ces métaux augmente (**Antoniadis et Mckinley, 2003**).

#### **IV.1. Effet des métaux lourds sur le sol et l'eau**

Les métaux lourds tels que Pb, As, Cd et Hg sont très répandus dans la nature à des concentrations élevées ils provoquent des perturbations environnementales (sol et l'eau). La contamination des sols par les métaux lourds est l'un des principaux problèmes environnementaux dans le monde, leurs présence peut affecter considérablement les propriétés physicochimiques du sol ainsi que la communauté microbienne et la réduction des activités environnementales et biologiques telles que la minéralisation de la matière organique (**Sheng et al., 2008 ; Wei et al., 2009 ; Gaur et al., 2013**).

Cependant, le degré de contamination du sol par les métaux dépend de plusieurs facteurs tels que la composition chimique, la toxicité, la mobilité et la variation de la biodisponibilité de ces contaminants. Dès que ces métaux lourds sont en contact avec la surface du sol, cette adsorption est suivie par une adsorption lente et une distribution dans le sol. Lorsque les plantes poussent sur un sol pollué par les métaux ils ont tendance à accumuler ces métaux lourds, ce qui affecte leur croissance et le risque atteindre les consommateurs (**Gaur et al., 2013**).

L'augmentation de la concentration des polluants dans les estuaires et les océans, en particulier celle des métaux traces, est à l'origine de nombreuses études dans différentes zones du globe. De plus la contamination peut atteindre les eaux de surface et les eaux souterraines par le biais de sources naturelles (lixiviation du minerai, érosion des minéraux avec les sédiments) ou d'activités humaines (engrais chimiques, pesticides, élimination des déchets solides industriels et des déchets domestiques) (**Kaimoussi et al., 2005 ; Gaur et al., 2013**).

#### **IV.2. Effet des métaux lourds sur les microorganismes**

Les métaux lourds exercent généralement une action inhibitrice sur les microorganismes. Ils bloquent les groupes fonctionnels, déplacent les ions métalliques essentiels, ou modifient le site actif des molécules biologiques, mais à faible concentration certains métaux sont essentiels pour les microorganismes (par exemple Co, Cu, Zn, Ni), car ils jouent le rôle de co-facteurs essentiels pour les métalloprotéines et les enzymes (**Hassen et al., 1998**)(a).

### IV.3. Effet des métaux lourds sur l'Homme :

Au cours des dernières décennies, la contamination de la chaîne trophique par les métaux lourds a attiré beaucoup d'attention grâce aux effets négatifs sur la santé humaine. De nombreux métaux lourds et métalloïdes sont toxiques et peuvent provoquer des effets indésirables et des intoxications graves, même à des concentrations très faibles, par exemple, ils peuvent provoquer un stress oxydant par formation de radicaux libres. Le stress oxydatif se traduit ainsi par la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui peut perturber les défenses antioxydantes intrinsèques des cellules et peuvent conduire à des dommages cellulaires ou la mort (Ali et al., 2013). 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 (Kakkar et al., 2005).

D'un point de vue toxicologique, les métaux lourds les plus toxiques sont : Hg, Cd, Pb et As (non essentiel) et Cu, Zn (essentiel) qui peuvent causer différents problèmes de santé en fonction du métal lourd concerné, sa concentration et son état d'oxydation, etc. Le **tableau 2** donne les effets nocifs de certains métaux lourds sur la santé humaine (Ali et al., 2013).

**Tableau 2 :** Effets nocifs des métaux lourds spécifiques sur la santé humaine. (Ali et al., 2013).

Métaux lourds	Effets nocifs
As	Comme l'arséniate est un analogue de phosphate il interfère ainsi avec les processus cellulaires essentiels tels que la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP
Cd	Cancérogène, mutagène, tératogène provoque une insuffisance rénale et une anémie chronique
Cr	Provoque la perte de cheveux
Cu	Des niveaux élevés endommagent le cerveau et les reins, induise une cirrhose du foie, une anémie chronique et une irritation intestinale
Hg	Maladies auto-immunes, dépression, problèmes d'équilibre, perte de cheveux, insomnie, perte de mémoire, des troubles de la vision, des tremblements,
Ni	Démangeaisons de nickel; l'inhalation peut causer un cancer des poumons, du nez et des sinus; les cancers de la gorge et l'estomac; la perte de cheveux
Pb	Altération du développement, intelligence réduite, perte de mémoire à court terme, une insuffisance rénale; maladies cardiovasculaires.
Zn	Le surdosage peut provoquer des étourdissements

## **V. Elimination des métaux lourds**

Actuellement, Les métaux lourds font partie des polluants les plus persistants dans l'environnement parce qu'ils ne sont pas biodégradables, pour cette raison les chercheurs ne cessent de développer des méthodes écologiques efficaces pour préserver et dépolluer l'environnement (**Díaz et al., 2006 ; Ali et al., 2013 ; Oves et al., 2013**).

En revanche, plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour éliminer les ions métalliques du sol et des solutions aqueuses, elles comprennent principalement des techniques physiques, chimiques et divers matériaux naturels d'origine biologique, y compris les bactéries, les champignons, les levures, les algues, etc (**Díaz et al., 2006; Wang et Chen, 2006; Abbas et al., 2014 (a)**).

### **V.1. Les techniques physico-chimiques**

Les techniques classique d'élimination des métaux lourds sont caractérisées par des procédés physico-chimiques tels que la précipitation chimique, les traitements électrochimiques, l'échange d'ions, l'adsorption (charbon, charbon actif), l'osmose inverse, la filtration sur membrane et l'extraction par solvant : ils sont disponibles pour le traitement du chrome et d'autres métaux lourds des eaux usées (**Wang et Chen, 2006 ; Bhattacharya et Gupta, 2013; Abbas et al., 2014**).

#### **Les inconvénients**

En général, les méthodes physiques et chimiques présentent ont certains inconvénients comme :

- Le coût élevé lors du traitement d'un grand volume d'eau et des eaux usées contenant des métaux lourds à faible concentration (**Gavrilescu, 2004 ; Wang et Chen, 2006**).
- Elles provoquent des changements irréversibles dans les propriétés du sol et des perturbations de la microflore du sol natal ;
- Elles peuvent créer des problèmes de pollution secondaire (**Ali et al., 2013**).

Pour ces raisons, la bioremédiation reçoit de plus en plus d'attention, elle montre de nombreux avantages par rapport aux méthodes traditionnelles tel que l'élimination efficace des métaux, même à de faibles concentrations (**Gaur et al., 2013; Singh et al., 2013**).

## V.2. Les techniques biologiques (la bioremédiation)

Dans la littérature, la bioremédiation provient de deux concepts : «bio (vivants) et remédiation (fixer ou guérison) ». Selon Glazer et Nikaido, la bioremédiation est définie comme un processus qui utilise des micro-organismes, plantes vertes ou des enzymes pour traiter les sites pollués (**Gaur et al., 2013; Gavrilesco, 2004 ; Sauge-Merle et al., 2003**).

La pollution par les métaux lourds reste un défi majeur pour la biotechnologie environnementale, pour y remédier, il faut faire appel à des techniques efficaces, moins coûteuses, et respectueuses de l'environnement. La bioremédiation est l'approche qui devient de plus en plus populaire à la dépollution (**Gavrilesco, 2004 ; Lyon et Vogel, 2013**). Généralement, les bioprocédés d'élimination des métaux sont regroupés dans l'une des deux catégories, la biosorption et la bioaccumulation (**Singh et al., 2013**).

### V.2.1. Bioremediation par phytoremediation

Le terme phytoremediation est un mot latin qui est composé de "phyto" (plante), et "remediation" (corriger ou supprimer un mal), elle est donc définie comme l'utilisation des plantes vertes et parfois l'utilisation de plantes et des microbes du sol associés pour éliminer les polluants de l'environnement ou pour les rendre inoffensifs (**Mohanty et Patra, 2011 ; Ali et al., 2013**).

### V.2.2. Bioremediation par biosorption

L'adsorption est l'incorporation d'une substance dans un état à un autre différent (par exemple liquides adsorbés par un solide ou gaz adsorbé par l'eau). L'adsorption est l'adhérence physique ou liaison des ions et des molécules sur la surface d'une autre molécule (**Juwarkar et Yadav, 2010**).

La biosorption est un processus physico-chimique qui implique des mécanismes tels que l'absorption, l'adsorption, l'échange d'ions, la complexation et la précipitation. Les métaux lourds interagissent avec les groupements fonctionnels de la biomasse microbienne tels que les groupements carboxyle, phosphate, hydroxyle, amine, thiol, etc (**Gaur et al., 2013 ; Abbas et al., 2014**). Il s'agit d'un processus indépendant du métabolisme, ce qui explique l'utilisation de la biomasse vivante et morte (**Abbas et al., 2014**). L'utilisation des cellules non-vivantes (mortes) est préférée par rapport aux cellules vivantes, car elles ne nécessitent pas de système de culture, ne sont pas affectées par les déchets toxiques et peuvent être manipulées plus facilement (**Ziagova et al., 2007**).



### V.2.3. Bioremediation par bioaccumulation

La bioaccumulation est un processus actif pour le transport de métaux lourds qui dépend de l'énergie métabolique des micro-organismes. Il se fait en deux temps : les ions métalliques sont initialement adsorbés à la surface extracellulaire puis des systèmes de transport spécialisés (pompes ioniques, canaux ioniques, endocytose... etc.) font entrer le métal à l'intérieur de la cellule (Nies, 1999; Juwarkar et Yadav, 2010 ; Issazadeh et al., 2013).

A l'inverse de la biosorption, le processus de bioaccumulation est relativement lent, de plus la récupération du métal accumulé s'effectue par des moyens destructifs de la cellule alors que dans la biosorption une désorption est réalisée par des procédés physiques simples sans endommager l'intégrité structurale de la cellule biosorbant (Issazadeh et al., 2013; Abbas et al., 2014). La biosorption et la bioaccumulation possèdent des caractéristiques différentes, qui sont résumés dans le **tableau 3**.

**Tableau 3 :** Comparaison entre les caractéristiques des processus de biosorption et de bioaccumulation des métaux lourds (Abbas et al., 2014)

Caractéristiques	Processus de biosorption	Processus de bioaccumulation
<b>Définition</b>	Procédé passif ; Peut utiliser des cellules microbiennes mortes.	Procédé actif ; Utilise les cellules vivantes.
<b>Affinité métallique</b>	Supérieure dans des conditions favorables.	Toxicité affecte l'absorption des métaux par des cellules vivantes, mais dans certains cas, il existe une forte accumulation de métal.
<b>Temps d'absorption des métaux</b>	Quelques secondes, généralement rapide.	Normalement, plus lent que biosorption.
<b>Température</b>	Dans une gamme modérée	Inhibée à basses températures
<b>Versatilité</b>	L'adsorption des métaux peut être affectée par des anions ou d'autres molécules ; La mesure de l'adsorption métallique dépendante du pH généralement.	Exige une source d'énergie ; Dépendant de l'activité ATPase membranaire.

### V.3. Les types biologiques de biosorbants

Les biomasses algale, fongique et bactérienne sont connus pour adsorber ou accumuler facilement les ions métalliques (Nithya et al., 2011).

Les algues sont disponibles en grandes quantités dans de nombreuses régions. La biomasse algale a été testée comme biosorbant grâce aux différents avantages tels que la faible exigence nutritionnelle, la production élevée de la biomasse, l'absence de substances toxiques lors de l'attachement avec les ions métalliques (Das et al., 2008 ; Juwarkar et Yadav, 2010 ; Abbas et al., 2014). De nombreuses études ont trouvé que les algues avaient une capacité de biosorber de nombreux métaux lourds, toutefois, elle reste moins utilisée par rapport aux champignons et aux bactéries (Wang et Chen, 2009 ; Juwarkar et Yadav, 2010).

Dans le domaine de la biosorption, les moisissures et les levures ont beaucoup d'intérêts, car ils sont faciles à cultiver, produisent des rendements élevés en biomasse et peuvent être manipulées génétiquement. Trois groupes de champignons ont une grande importance pratique: les moisissures, les levures et les champignons. Les champignons comme *Neurospora sitophila*, *Penicillium chrysogenum* et *Penicillium lilacinum* ont été considérés comme un utile pour l'élimination des métaux précieux, en particulier de l'uranium (Nakajima et Sakaguchi, 1986 ; Gavrilescu, 2004 ; Wang et Chen, 2009 ; Juwarkar et Yadav, 2010).

Les bactéries ont été utilisées comme biosorbants en raison de leur petite taille, leur abondance dans la terre, et leur capacité à croître dans des conditions contrôlées. Certaines espèces bactériennes telles que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Escherichia*, *Micrococcus*, etc, ont été testés pour l'adsorption des métaux ou des composés organiques (Juwarkar et Yadav, 2010).

### V.4. Les interactions entre les bactéries et métaux lourds

Les microorganismes, en particulier les bactéries, peuvent interagir avec les métaux via différents mécanismes susceptibles de modifier la biodisponibilité des métaux (Ledin, 2000 ; Juwarkar et Yadav, 2010).

On peut observer une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Par exemple, plusieurs microbes ont été choisis pour catalyser ces réactions conduisant à des changements dans la mobilité des métaux dans le sol. La production de substances chélatrices des métaux telles que les composés organiques ou des sulfides a été également observée. Ces modifications effectuées lors une interaction des métaux avec le microorganisme soit par le phénomène d'adsorption passive ou par transport actif à l'intérieur de

la cellule (Haferburg et Kothe, 2007; Juwarkar et Yadav, 2010). Les principaux types d'interactions sont résumés dans la figure 1.

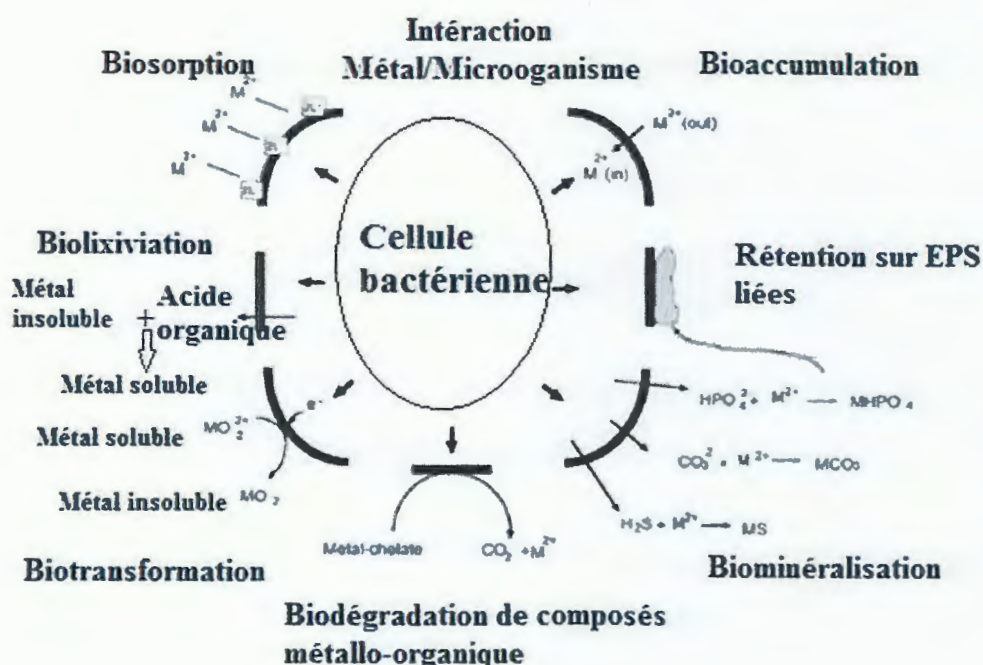


Figure 1 : Schéma des interactions entre métaux et microorganismes (Juwarkar et Yadav, 2010).

### V.5. Interactions des EPS bactériens avec les métaux lourds

Les polymères de surface (exopolysaccharides (EPS)) sont des polymères biosynthétique produits par des microorganismes procaryotes et eucaryotes qui fournissent une barrière protectrice pour les cellules contre les contraintes de l'environnement, ils sont localisés à la surface cellulaire bactérienne, et composés d'une variété de macromolécules telles que les polysaccharides, les protéines, les acides nucléiques, et les phospholipides (Kazy et al., 2002 ; Pal et Paul, 2008).

Les interactions électrostatiques entre les ligands métalliques et les composants des biopolymères chargés négativement jouent un rôle dans la biosorption des métaux lourds. En outre, les activités enzymatiques dans les EPS contribuent également à la détoxification des métaux lourds potentiellement toxiques par la transformation et la précipitation subséquente dans la masse polymère (Mclean et al., 1996 ; Pal et Paul, 2008).

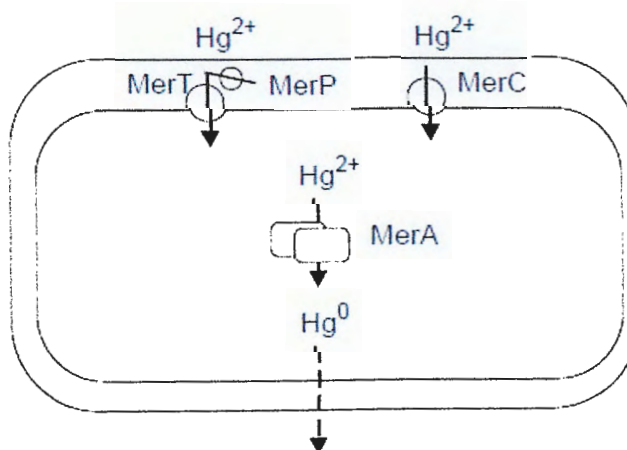
## VI. Les mécanismes de résistance aux métaux lourds

Les bactéries ont développé une variété de mécanismes de résistance pour faire face contre le stress des métaux lourds. Ces mécanismes comprennent la séquestration intracellulaire ou extracellulaire des métaux lourds par des éléments de liaison spécifiques aux ions minéraux, la réduction d'un métal à un composé moins toxique, et l'efflux directe d'un métal hors de la cellule, la modification des systèmes de transport membranaire, et la transformation enzymatique (Llanos et al., 2000 ; Teitzel et al., 2003).

Les bactéries adaptées aux métaux lourds montrent une résistance portée sur divers systèmes y compris le chromosome, les plasmides et les transposons, la plupart de ces mécanismes de résistance sont portés sur des plasmides et surtout associés aux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bruins et al., 2000).

Par exemple, le mercure  $Hg^{2+}$  est transporté à l'intérieur de la cellule par les transporteurs *merT* et *merP* où il est réduit par le *merA* à la forme  $Hg^0$  qui est volatile et qui est diffusée à travers la membrane vers le milieu extracellulaire. Les gènes *merT*, *merP* et *merC* ont été impliqués dans le transport de mercure : *merT* (protéine de la membrane interne) interagit avec la protéine périplasmique liant le mercure qui est le *merP*, le *merC* (protéines de la membrane interne) peut s'ajouter ou substituer le mécanisme de transport de *merT* (figure 2) (Hamlett et al., 1992 ; Chang et al., 1997 ; Teitzel et al., 2003). L'efflux du  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  est effectué par des ATPase de type P dans le cas des bactéries à Gram positif et par des pompes à efflux de type RND dans les bactéries à Gram négatif (Nies, 1999).

L'arséniate ( $AsO_4^{3-}$ ) est réduit en arsénite ( $AsO_2^-$ ) par les protéines *ArsC* dans la cellule ce dernier est ensuite transporté vers le milieu extracellulaire par le *ArsB* et *ArsA* ATPase de type A (Nies, 1999).



**Figure 2** : Représentation schématique du transport et des mécanismes de résistance au mercure chez les bactéries (Nies, 1999).

## VII. Applications des biofilms dans la bioremediation

Un biofilm est constitué de micro-organismes adhérant à une surface ou une interface en milieu humide ou aqueux on parle alors de communautés microbiennes structurées qui jouent un rôle important dans les processus biogéochimiques de la biosphère. Ces micro-organismes sont englobés dans une matrice généralement constituée de polymères extracellulaires ou EPS ("extrapolymeric substances") sécrétés par ces mêmes micro-organismes (**Flemming et al., 1999 ; Sutherland, 2001 ; Nikolaev et Plakunov, 2007**).

L'application des biofilms dans l'élimination des métaux lourds semble prometteuse. La distribution et la diversité des microbes (bactéries, champignons, algues et protozoaires) qui peuplent les sites contaminés et les gènes qui codent pour les phénotypes responsables des interactions métal-microbe sont des éléments cruciaux de la bioremédiation des métaux lourds. Dans l'étude rapportée par White et Gadd, les chercheurs ont montré que des biofilms bactériens sulfato-réducteurs cultivés en culture continue et exposés à un milieu qui contient du cuivre, le métal accumulent sous forme de sulfure de cuivre, ils ont également observé une augmentation simultanée de la teneur en EPS du biofilm, ce qui indique leur rôle dans l'immobilisation des précipités métalliques (**Singh et al., 2006**).

La bioremediation par biofilm a une meilleure chance d'adaptation et de survie (en particulier pendant les périodes de stress) par rapport aux cellules planctoniques, d'ailleurs : des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* dans les biofilms accumulaient des quantités plus élevées de métaux par rapport aux cellules planctoniques (**Teitzel et al., 2003 ; Singh et al., 2006 ; Nagashetti et al., 2013**).

# *Matériel et méthodes*

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'Université de Jijel, durant la période Avril-Mai de l'année 2015.

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

## **I. Matériel**

### **I.1. Les souches bactériennes**

Deux souches bactériennes ont été utilisées dans cette étude.

- *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) isolée de la boue activée de la tannerie de Jijel.
- *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) isolée de la boue activée de la station d'épuration de Jijel.

La pureté des souches bactériennes a été vérifiée en les repiquant individuellement sur gélose nutritive.

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

Les milieux de culture utilisés pour ce travail sont :

- Le bouillon nutritif (BN) (Institut Pasteur)
- La gélose nutritive (GN) (Institut Pasteur)
- La gélose Muller Hinton

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

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

- Bec Bunsen
- Bain marie (Gerhardt)
- Balance (KERN 446-35A)
- Plaque chauffante agitatrice (VELP SCIENTIFIC)
- Etuve (37°C) (Memmert)
- Incubateur agitateur (INFORS HT ECOTRON)
- Autoclave (Pbi Brand)
- Vortex (VWR)
- Réfrigérateur (ENIEM)

- pH mètre (Hanna)
- Spectrophotomètre (JENWAY 7315)
- Centrifugeuse (BIOBLOCK SCIENTIFIC)
- Spectrophotomètre d'absorption atomique (AA-6200 SHIMADZU)
- Filtres millipores 0.22µm (Sartorius)
- Micropipette (100µl et 1000 µl)

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

- Nitrate de plomb  $Pb(NO_3)_2$
- Dichromate de potassium  $K_2Cr_2O_7$
- Nitrate de fer  $Fe(NO_3)_3$
- Le chlorure de mercure  $HgCl_2$
- L'acide nitrique à 1%

#### **I.5. Disques d'antibiotiques (Oxoid)**

- Gentamicine (10 µg)
- Trimethoprim sulphamethoxazole (25µg)
- Tetracycline (30µg)
- Ampicilline (10µg)
- Erytromycine (15µg)
- Compound sulphonamides (300µg)
- Penicilline G (10µg)
- Amoxicilline (25µg)
- Colistin sulphate (50µg).

## **II. Méthodes**

### **II.1. Revivification des souches**

Avant chaque test les cultures doivent être revivifiées. Les deux souches sontensemencées dans 5 ml de bouillon nutritif, ensuite elles sont incubées à 37°C pendant 18 h.



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

**SM1:** Fer 1000 mg/L

mM (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) = 241.86 g/mol

mM (Fe) = 55.84 g/mol

La masse de (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) pour préparer la solution mère à 1000 mg/L est :

$$m = 1000 * 241.86/55.84$$

m (Fe) = 4.3g

Donc 4.3g de nitrate de Fer sont dissous dans 1L d'eau distillée (Guo et al., 2010).

**SM2:** Plomb 1000 mg/L

mM (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) = 331.21g/mol

mM (Pb) = 207.2g/mol

La masse de (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) pour préparer la solution mère à 1000 mg/L est :

$$m = 1000 * 331.21/207.2 = 1.6g$$

1.6g de nitrate de plomb sont dissous dans 1L d'eau distillée (Kinoshita et al., 2013).

**SM3:** Chrome 1000 mg/L

mM (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) = 294.2 g/mol

mM (Cr) = 51.99 g/mol

La masse de (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) pour préparer la solution mère à 1000 mg/L est :

$$m = 1000 * 294.2/51.99 = 5.65g$$

5.65g de dichromate de potassium sont dissous dans 1L d'eau distillée (Guo et al., 2010).

**SM4:** Mercure 1000 mg/L

mM (HgCl<sub>2</sub>) = 271.496 g/mol

mM (Hg) = 200.59 g/mol

La masse de (HgCl<sub>2</sub>) pour préparer la solution mère à 1000 mg/L est :

$$m = 1000 * 271.496/200.59 = 1.35g$$

1.35g de chlorure de mercure sont dissous dans 1L d'eau distillée (Guo et al., 2010).

## II.3. Screening des métaux lourds tolérés par les souches bactériennes

Ce test permet de sélectionner les souches les plus efficaces ayant la capacité la plus importante de croître sur le bouillon nutritif contenant différents métaux : Cr, Pb, Hg, Fe. 1ml de l'inoculum bactérien (*Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>)) est ajouté dans 50 ml de bouillon nutritif avec une concentration initiale de 1 mg/L et 10mg/L pour chaque métal. Les cultures ont été incubées sous agitation (150 rpm) à 37°C pendant 72 h, les mesures de la densité optique à 600 nm ont été effectuées chaque 24h (Guo et al., 2010 ; Sen et al., 2013).

#### II.4. Calcul du taux de croissance

Le taux de croissance des souches est calculé selon l'équation suivante (Wei et al., 2009) :

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

DO<sub>t</sub> : densité optique dans une valeur du temps.

DO<sub>0</sub> : densité optique du temps initial.

μ : le taux de croissance.

T<sub>t</sub> : le temps après l'incubation.

T<sub>0</sub> : le taux initial.

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

Ce test permet de déterminer la plus faible concentration du métal donnant lieu à une inhibition totale de la croissance bactérienne.

Pour mesurer la concentration minimale inhibitrice pour nos souches (*Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>)), nous avons utilisé la méthode de dilution sur tube qui consiste à faire une série de dilutions croissantes de la solution mère du métal (le plomb et le mercure).

Premièrement, les souches bactériennes ont été cultivées dans le bouillon nutritif pendant 18 h à 37°C. Après incubation 1 ml de l'inoculum de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) a été transféré dans chaque tubes contenant des concentrations croissantes en Hg (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/L) obtenues par dilution de la solution mère (SM4) ayant une concentration de 1000 mg/L. 1 ml de l'inoculum de *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) a été transféré dans des tubes contenant des concentrations croissantes en Pb (de 10 à 400 mg/L) de la solution mère (SM2) ayant aussi une concentration de 1000 mg/L, avec un volume final de 10 ml du bouillon nutritif pour chaque tube (Hassen et al., 1998)(a). Les densités optiques sont mesurées à 600 nm après une période d'incubation de 24 h à 37°C (Abbas et al., 2014 (b)).

#### II.6. Détermination de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques

La résistance et la sensibilité aux antibiotiques des souches résistantes aux métaux lourds sont déterminées selon la méthode de diffusion sur disque de Kirby-Bauer. Les antibiotiques: amoxicilline (Am, 25 μg), la tétracycline (TET, 30 ug), Gentamicin (GEN, 10 μg), Trimethoprimsulphamethoxazole (SXT, 25 μg), Ampicillin (AM, 10 μg), Erytromycin (ERY, 15 μg), Compound sulphonamides (S<sub>3</sub>, 300 μg), Penicillin (P, 10 μg), Colistinsulphate (CT, 50 μg) ont été utilisés. Les boîtes de Pétri contenant la gélose Muller Hinton sontensemencées par une

suspension bactérienne de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) ajustée à une DO à 600 nm de 0,8. Les disques d'antimicrobiens préparés ont été placés sur les boîtes inoculées. Après incubation à 37°C pendant 24 h, les souches ont été classés comme sensibles ou résistantes à un antibiotique en fonction du diamètre de zone d'inhibition donné dans le tableau de disque d'antibiotique standard (Ao-Amer et al., 2013 ; Singh et al., 2013).

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

Les cultures bactériennes, qui ont été ajustées à une densité optique à 600 nm égale à 1, ont été utilisées comme inoculum. 1% (v / v) d'inoculum bactérien a été ajouté au bouillon nutritif en l'absence ou en présence du métal :

- Hg à 50 mg/L pour *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et ;
- Pb à 380 mg/L pour *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>).

Les concentrations de métaux étudiés ont été choisies compte tenu de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque culture (Hassen et al., 1998(b) ; Siripornadulsil et Siripornadulsil, 2013). Enfin, les cultures ont été incubées à 37°C pendant 48h. La croissance cellulaire a été déterminée en mesurant la densité optique à 600 nm toutes les 2 heures. Le pH a été mesuré à l'aide du pH mètre chaque 24 h (Siripornadulsil et Siripornadulsil, 2013).

## **II.8. Bioaccumulation du Pb par *Bacillus megaterium***

### **II.8.1. Bioaccumulation de plomb**

Deux erlenmeyers contenant 50 ml de BN dont l'un d'eux a été supplémenté par le Pb à une concentration égale à 200 mg/L. 2% de la culture bactérienne de *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) préalablement activée a été ajoutée dans chacun des deux erlenmeyers, les cultures ont été incubées à 37°C pendant 48 h (Costa et al., 2001).

Des échantillons (2ml) ont été prélevés toutes les 24 heures, Après centrifugation, les surnageants ont été filtrés et conservés à 4°C pour l'analyse de plomb dans le milieu extracellulaire et ce par spectrophotomètre d'absorption atomique, cet essai concerne seulement les cultures en présence du métal.

### **II.8.3. Lyse cellulaire**

Après incubation, les cellules bactériennes ont été recueillies par centrifugation à 4000g pendant 15 min. Le culot ainsi obtenu a été pesé pour déterminer le poids humide de la biomasse, ensuite est lavé trois fois avec l'eau deionisée. La lyse des cellules a été réalisée en mettant les cellules en contact avec l'acide nitrique à 1% à 4°C dans un volume final de 2.5 ml pendant 24 h. Le surnageant après centrifugation été filtré par des filtres millipores 0.22µm (Mehta et al., 2002).

La concentration en plomb a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique (Hussein et al., 2005).

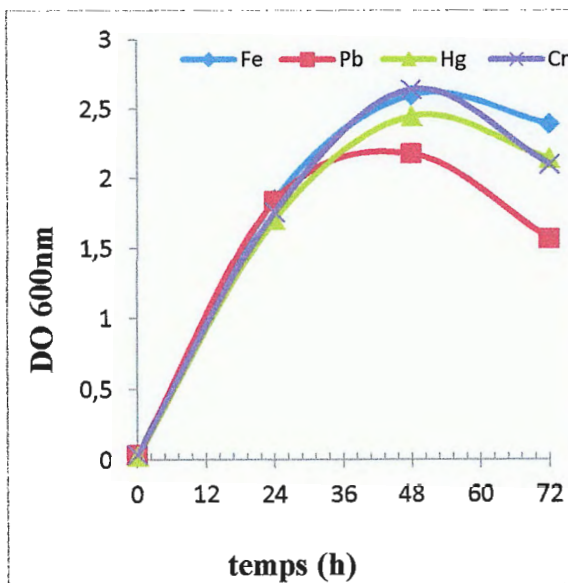
# *Résultats et discussion*

### I. Screening des métaux lourds tolérés par les souches bactériennes

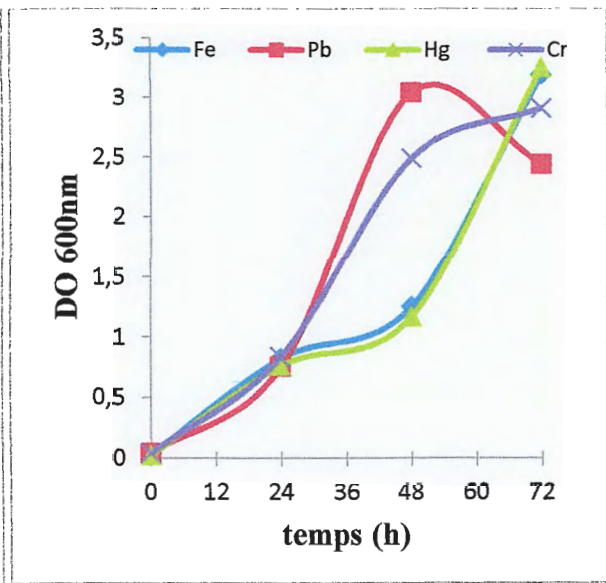
A partir de ce test, nous avons pu sélectionner le métal le plus toléré par *Pseudomonas* sp. ( $S_4$ ) et *Bacillus megaterium* ( $A_{31}$ ), la survie des deux souches a été testée en présence de 1mg/L de chaque métal. Les résultats obtenus sont montrés dans les figures (3) et (4).

La figure 3 montre que *Pseudomonas* sp. ( $S_4$ ) a une croissance rapide durant les 48 heures d'incubation en présence de tous les métaux avec une diminution dans les heures suivantes, le taux de croissance de *Pseudomonas* sp. ( $S_4$ ) est le plus élevé pour le mercure ( $\mu = 2.695 \text{ h}^{-1}$ ), toutefois, avec les autres métaux, les valeurs du taux de croissance varient;  $2.042 \text{ h}^{-1}$ ,  $2.145 \text{ h}^{-1}$  et  $1.997 \text{ h}^{-1}$  pour le Fe, Pb et Cr, respectivement (tableau 4).

D'après la figure 4, on remarque que *Bacillus megaterium* ( $A_{31}$ ) a une croissance rapide durant les 72 heures d'incubation, sauf qu'avec le Pb, où il y a une diminution de la croissance cellulaire après 48 heures, de plus, elle a un taux de croissance élevé avec le mercure ( $\mu = 1.135 \text{ h}^{-1}$ ) ce taux diminue avec les autres  $0.997 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.743 \text{ h}^{-1}$  et  $0.751 \text{ h}^{-1}$  pour le Fe, Pb et Cr, respectivement (tableau 4).



**Figure 3:** Cinétique de croissance de *Pseudomonas* sp. ( $S_4$ ) dans le bouillon nutritif additionné de 1mg/L de Fe, Pb, Hg et Cr.



**Figure 4:** Cinétique de croissance de *Bacillus megaterium* ( $A_{31}$ ) dans le bouillon nutritif additionné de 1mg/L de Fe, Pb, Hg et Cr.

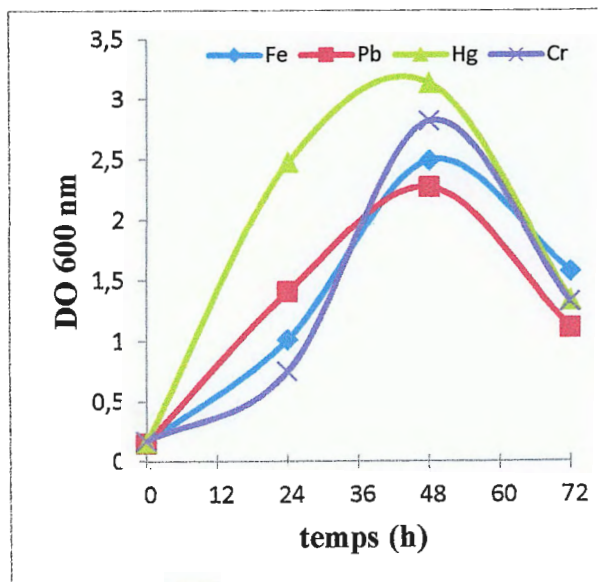
**Tableau 4 :** Le taux de croissance des deux souches dans le BN contenant le métal à 1 mg/l

Métal	Taux de croissance ( $\mu$ )	
	<i>Bacillus megaterium</i> (A <sub>31</sub> )	<i>Pseudomonas</i> sp. (S <sub>4</sub> )
Fe	0.997 h <sup>-1</sup>	2.042 h <sup>-1</sup>
Pb	0.743 h <sup>-1</sup>	2.145 h <sup>-1</sup>
Hg	1.135 h <sup>-1</sup>	2.695 h <sup>-1</sup>
Cr	0.751 h <sup>-1</sup>	1.997 h <sup>-1</sup>

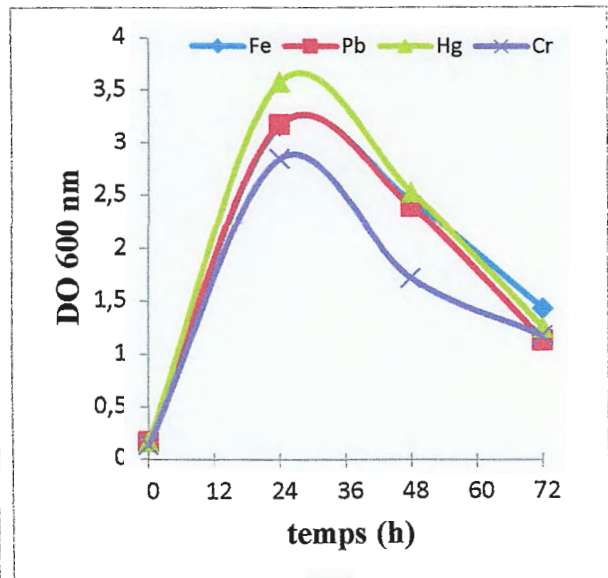
La survie des souches bactériennes a été également évaluée en présence de 10 mg/L de chaque métal, les résultats sont montrés dans les figures 5 et 6.

A partir de ces résultats, nous constatons que la croissance cellulaire des deux souches augmente en fonction du temps jusqu'à 48 heures pour *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) et 24 heures pour *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) où elle commence à diminuer.

La figure 5 montre que *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) a une croissance rapide en présence de tous les métaux durant les 48 heures d'incubation, après cette période une diminution de la croissance cellulaire a été observée, de plus, elle a un taux de croissance élevé avec le mercure ( $\mu = 0.615 \text{ h}^{-1}$ ) celui-ci diminue avec les autres métaux, Pb ( $\mu = 0.347 \text{ h}^{-1}$ ), Fe ( $\mu = 0.228 \text{ h}^{-1}$ ) et Cr ( $\mu = 0.141 \text{ h}^{-1}$ ) (tableau 5).



**Figure 5:** Cinétique de croissance de *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) dans le bouillon nutritif additionné de 10 mg/l de Fe, Pb, Hg et Cr.



**Figure 6:** Cinétique de croissance de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) dans le bouillon nutritif additionné de 10 mg/l de Fe, Pb, Hg et Cr.

Pareillement, la **figure 6** montre que *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) a une croissance rapide durant les 24 heures d'incubation pour tous les métaux avec une diminution remarquable dans les heures suivantes, le taux de croissance de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) pour le mercure, le fer et le chrome est proche (**tableau 5**) Hg ( $\mu = 0.826 \text{ h}^{-1}$ ), Fe ( $\mu = 0.815 \text{ h}^{-1}$ ), Cr ( $\mu = 0.807 \text{ h}^{-1}$ ), toutefois, il diminue avec le plomb ( $\mu = 0.737 \text{ h}^{-1}$ ).

**Tableau 5:** taux de croissance des deux souches dans le BN contenant le métal à 10mg/l

Métal	Taux de croissance ( $\mu$ )	
	<i>Bacillus megaterium</i> (A <sub>31</sub> )	<i>Pseudomonas</i> sp. (S <sub>4</sub> )
Fe	0.228 h <sup>-1</sup>	0.815 h <sup>-1</sup>
Pb	0.347 h <sup>-1</sup>	0.737 h <sup>-1</sup>
Hg	0.615 h <sup>-1</sup>	0.826 h <sup>-1</sup>
Cr	0.141 h <sup>-1</sup>	0.807 h <sup>-1</sup>

D'après les résultats de ce test, nous remarquons que lorsque la concentration du métal augmente, la croissance bactérienne diminue, ce qui se manifeste par la différence du taux de croissance des souches avec les deux concentrations (1 mg/L et 10 mg/L), donc on peut conclure que ces métaux présentent un certain degré de toxicité sur la croissance de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>).

Les résultats du screening ont montré que les deux souches sont capables de croître lorsqu'elles sont exposées aux métaux notamment le Fe, Pb, Cr et Hg. Pareillement, **Odokuma et Akponah (2010)** ont trouvé que *Bacillus* et *Pseudomonas* toléraient la présence du Fe et du Pb à une concentration de 1 mg/L. **Srinath et ses collaborateurs (2002)** ont étudié la résistance de souches bactériennes isolées à partir des effluents traités d'une tannerie au Cr (VI) à une concentration de 50 mg/L et ils ont trouvé que *Bacillus megaterium* était capable de résister à ce dernier. De plus, **Green- Ruiz (2006) et Abdul - Sada (2009)** ont trouvé que *Bacillus* sp et *Pseudomonas aeruginosa* résistaient au Hg à plus de 10 mg/L.

Selon la littérature scientifique, certains auteurs ont constaté que les bactéries sont capables d'adsorber les métaux à leur surface cellulaire, d'autres sont capables d'introduire les métaux à l'intérieur de la cellule ou le cytoplasme, cette résistance des bactéries aux métaux lourds peut être le résultat de l'acquisition de gènes de résistances aux métaux lourds portés généralement sur des plasmides (**Malik, 2004; Odokuma et al., 2010; Akujobi et al., 2012**).

En ce basant sur les résultats des taux de croissance en présence des métaux, nous avons choisi de travailler sur deux métaux qui sont les mieux tolérés et qui sont le Pb et le Hg.



En ce basant sur les résultats des taux de croissance en présence des métaux, nous avons choisi de travailler sur deux métaux qui sont les mieux tolérés et qui sont le Pb et le Hg.

## II. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

A partir de ce test on peut déduire la plus faible concentration du métal dans laquelle aucune croissance cellulaire n'est observée. Les résultats de la CMI sont montrés dans les **tableaux 6** et **7**:

**Tableaux 6** : Cinétique de croissance de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) à différentes concentrations de mercure.

concentration (mg/L) Temps(h)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
t = 0	0.101	0.139	0.139	0.132	0.149	0.142	0.143	0.143	0.152	0.167
t = 24	1.126	0.956	0.367	0.320	0.144	0.050	0.056	0.056	0.062	0.048

**Tableaux 7** : Cinétique de croissance de *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) à différentes concentrations de Plomb.

Temps (h) Concentration (mg/L)	t = 0	t = 24
10	0.092	0.836
20	0.120	0.948
30	0.121	0.848
40	0.130	0.856
50	0.136	0.896
60	0.085	0.774
70	0.113	0.737
80	0.101	0.881
90	0.122	0.805
100	0.123	0.923
110	0.073	0.756
120	0.073	0.707
130	0.107	0.602
140	0.095	0.615

<b>150</b>	0.117	0.604
<b>160</b>	0.126	0.589
<b>170</b>	0.113	0.660
<b>180</b>	0.120	0.548
<b>190</b>	0.137	0.679
<b>200</b>	0.129	0.612
<b>210</b>	0.100	0.569
<b>220</b>	0.120	0.523
<b>230</b>	0.135	0.489
<b>240</b>	0.129	0.488
<b>250</b>	0.188	0.473
<b>260</b>	0.126	0.369
<b>270</b>	0.117	0.380
<b>280</b>	0.143	0.403
<b>290</b>	0.098	0.425
<b>300</b>	0.112	0.308
<b>310</b>	0.175	0.369
<b>320</b>	0.232	0.516
<b>330</b>	0.097	0.310
<b>340</b>	0.168	0.320
<b>350</b>	0.125	0.391
<b>360</b>	0.149	0.236
<b>370</b>	0.138	0.335
<b>380</b>	0.107	0.106
<b>390</b>	0.123	-
<b>400</b>	0.280	-
<b>410</b>	0.199	-
<b>420</b>	0.160	-
<b>430</b>	0.164	-
<b>440</b>	0.143	-
<b>450</b>	0.103	-

- La concentration minimale du Hg inhibitrice de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) est égale à 50mg/L.
- La concentration minimale du Pb inhibitrice de *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) est égale à 380mg/L.

Ces résultats sont comparés avec d'autres, notamment les résultats obtenus par **Ahmad et Malik (2012)** qui ont trouvé que la CMI de *Pseudomonas* pour le Hg est égale à 50 µg/ml, cette valeur est similaire à celle trouvée dans notre expérience.

Les résultats obtenus par **Singh et ses collaborateurs (2013)** ont montré que la CMI de *Bacillus* spp. pour le Pb est égale à 200 µg/ml.

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

Ce test nous a permis d'évaluer l'effet de la présence du Pb et du Hg sur l'allure de la courbe de croissance des souches *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) et *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>), respectivement.

Les **figures 7 et 8** montrent que la croissance des souches était plus élevée en absence du métal (Pb et Hg) tandis qu'en sa présence la croissance était plus faible. Durant la phase de latence des souches cultivées dans le BN sans métal et celles cultivées dans le BN avec le métal, la croissance est très lente.

Une augmentation du pH en fonction du temps dans tous les milieux (en absence ou en présence du métal pour les deux souches) est remarquée, le pH atteint jusqu'à 8.69 après 48 h d'incubation.

En plus, on observe que le taux de croissance des deux souches diminue lorsqu'on ajoute le métal dans le milieu (**tableau8**), ces résultats sont logiques étant donné que les métaux montrent une certaine toxicité notamment à forte concentration. **Wei et ses collaborateurs (2009)** ont étudié l'effet des métaux lourds sur la croissance de la souche CCNWR33-2 (*Agrobacterium tumefaciens* LMG196), ils ont trouvé que son taux de croissance était plus faible lorsque le milieu est supplémenté par le Pb à une concentration de 2 mM.

D'autres résultats rapportés par **Roane (1999)** ont montré que le Pb (0.3 mM et 0.1 mM) a un effet négatif sur la croissance de *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas marginalis*, respectivement.

Les résultats obtenus à partir de cette expérience ont confirmé notre conclusion déduite du test de criblage des souches concernant la toxicité des métaux sur la croissance cellulaire.

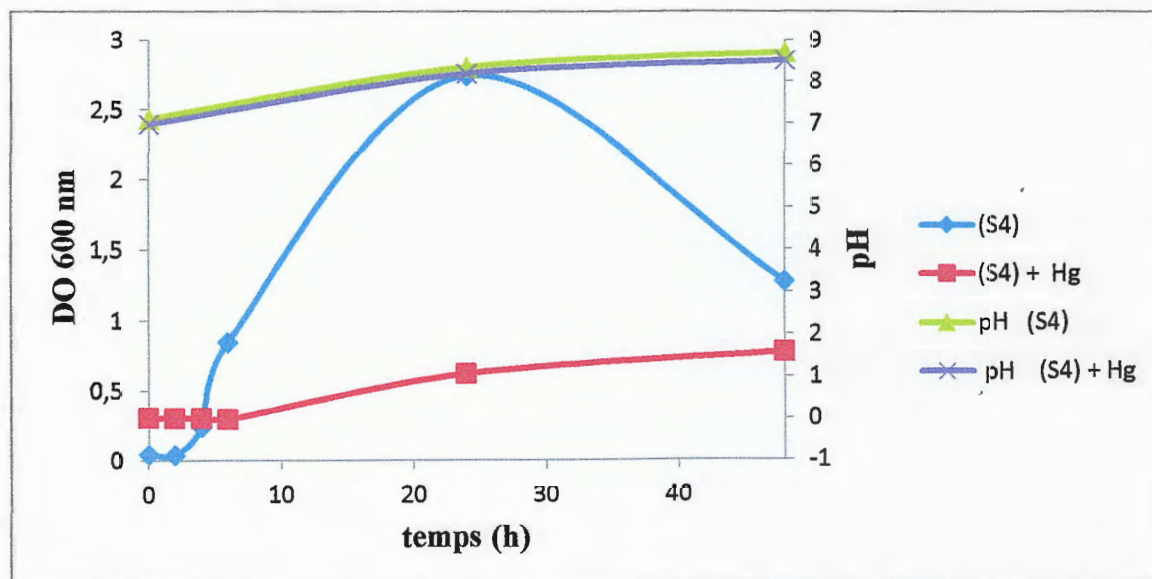


Figure 7: Cinétique de croissance de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) dans le bouillon nutritif en présence et en absence du Hg à 30 mg/L et l'évolution du pH.

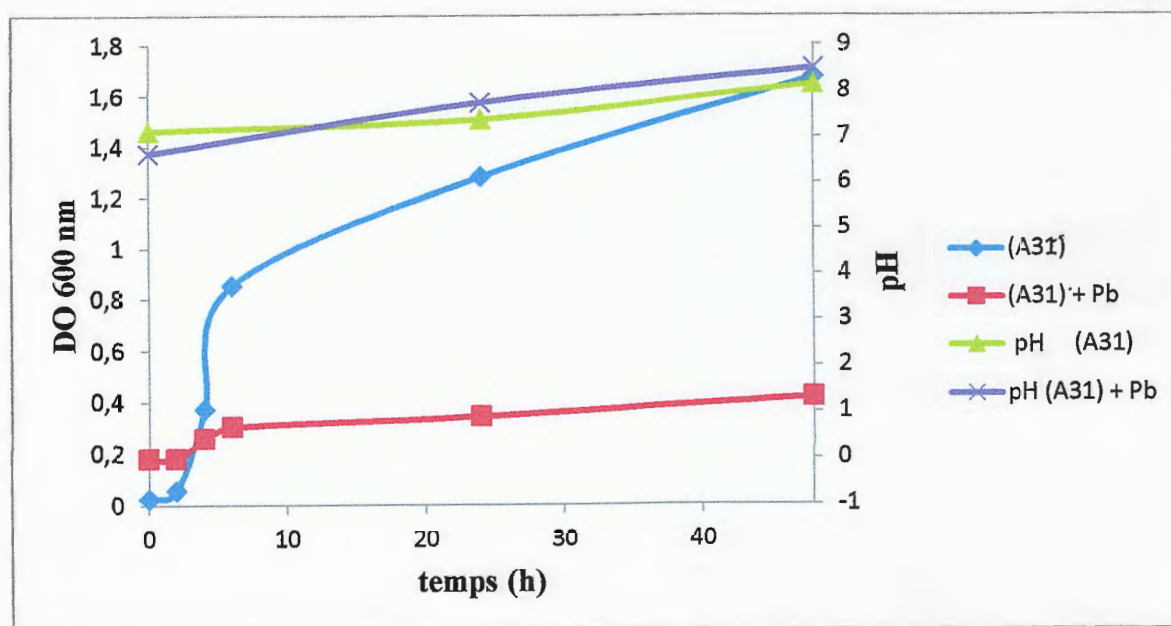


Figure 8: Cinétique de croissance de *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) dans le bouillon nutritif en présence et en absence du Pb à 200 mg/L et l'évolution du pH.

Ces figures indiquent qu'il y a une augmentation du pH en fonction du temps dans tous les milieux soit en absence ou en présence du métal pour les deux souches.

**Tableau 8 :** Taux de croissance des deux souches en présence et en absence du métal.

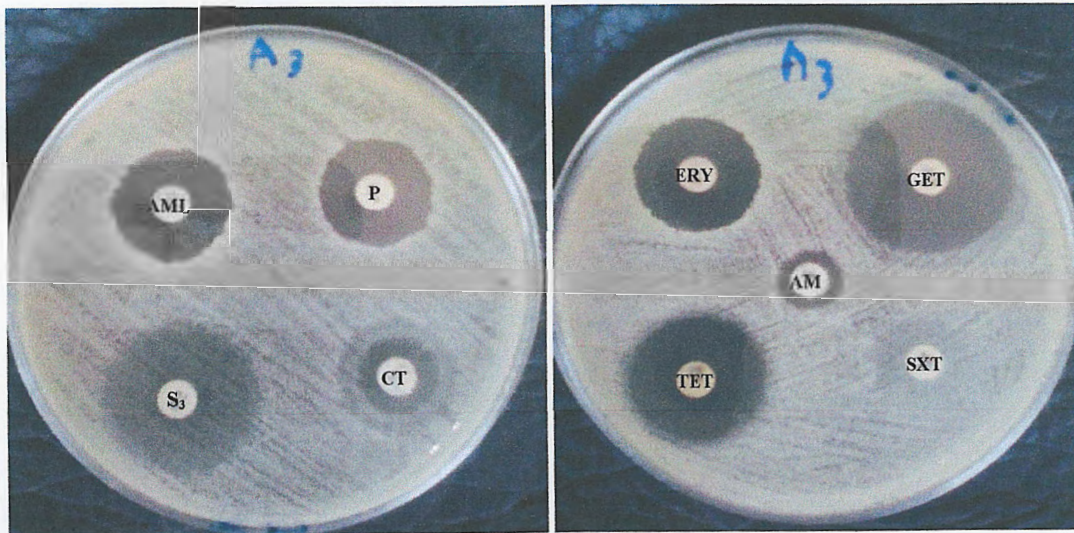
Souches	Taux de croissance ( $\mu$ )
<i>Bacillus megaterium</i> (A <sub>3</sub> 1)	3.105 h <sup>-1</sup>
<i>Bacillus megaterium</i> (A <sub>3</sub> 1) + Pb	0.297 h <sup>-1</sup>
<i>Pseudomonas</i> sp. (S <sub>4</sub> )	2.261 h <sup>-1</sup>
<i>Pseudomonas</i> sp. (S <sub>4</sub> ) + Hg	1.753 h <sup>-1</sup>

#### IV. Détermination de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques

Ce test permet d'évaluer la capacité des souches sélectionnées à résister aux antibiotiques, ces souches étant destinées être appliqué en bioremédiation.

Le profil de résistance des deux souches bactériennes montre qu'elles sont résistantes à une multitude d'antibiotiques notamment *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) qui est résistante à 7 des 9 antibiotiques testés.

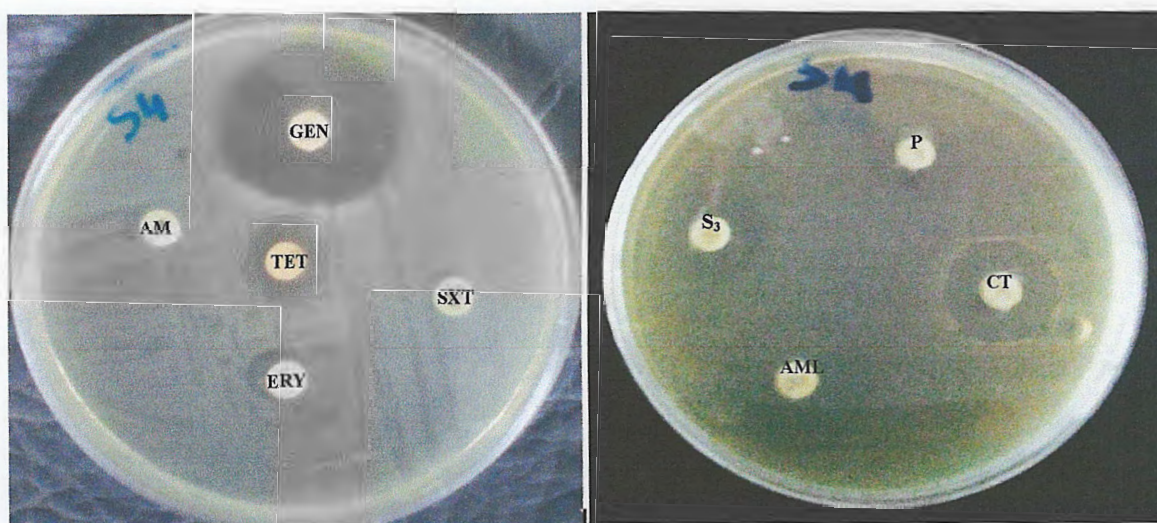
En absence de données relatives aux concentrations de ces médicaments dans le milieu d'isolement (boue de la tannerie et composte), il serait donc impossible de prédire l'origine de cette résistance. Toutefois, cette propriété confère aux souches la capacité de survivre et de contourner leur présence dans les eaux usées, ce qui permet d'accroître leur potentiel biodépolluant dans les stations d'épuration des eaux usées.



**Figure 9 :** Photographie représentant les résultats de l'antibiogramme pour *Bacillus megaterium* (A<sub>3</sub>1).

**Tableau 9** : Résistance et sensibilité de *Bacillus megaterium* (A<sub>3</sub>1) aux antibiotiques

Antibiotiques	Diamètre (mm)	Résistant/Sensible
Gentamicine (10 µg)	28	Sensible
Trimethoprim sulphamethoxazole (25 µg)	/	Résistant
Tetracycline (30 µg)	22	Sensible
Ampicilline (10 µg)	10	Résistant
Erytromycine (15 µg)	20	Résistant
Compound sulphonamides (300 µg)	/	Résistant
Penicilline G (10 µg)	20	Sensible
Amoxycilline (25 µg)	20	Sensible
Colistin sulphate (50 µg)	14	Sensible



**Figure 10** : Photographie représentant les résultats de l'antibiogramme pour *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>).

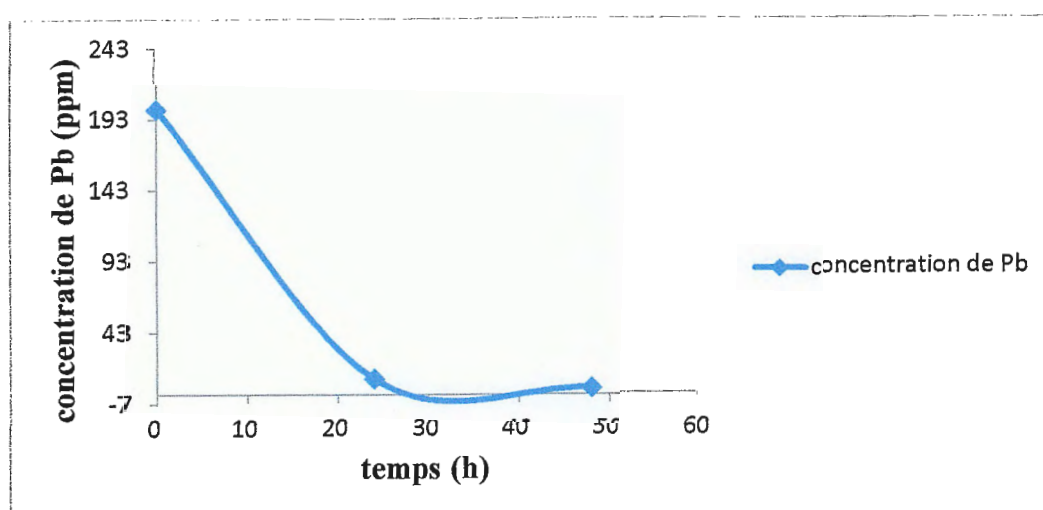
**Tableau 10 :** Résistance et sensibilité de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) aux antibiotiques

Antibiotiques	Diamètre (mm)	Résistant/Sensible
Gentamicin (10 µg)	28	Sensible
Trimethoprim sulphamethoxazole (25 µg)	/	Résistant
Tetracycline (30 µg)	12	Résistant
Ampicilline (10 µg)	/	Résistant
Erytromycine (15 µg)	/	Résistant
Compound sulphonamides (300 µg)	19	Résistant
Penicilline G (10 µg)	/	Résistant
Amoxycilline (25 µg)	/	Résistant
Colistin sulphate (50 µg)	20	Sensible

### V. Test de bioaccumulation du Pb

Le test de bioaccumulation du Pb nous a permis de suivre l'évolution de la concentration du Pb dans le milieu extracellulaire sous l'action de *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>), d'une part, et dans les mêmes conditions, la quantité de Pb accumulée par les cellules a été également mesurée.

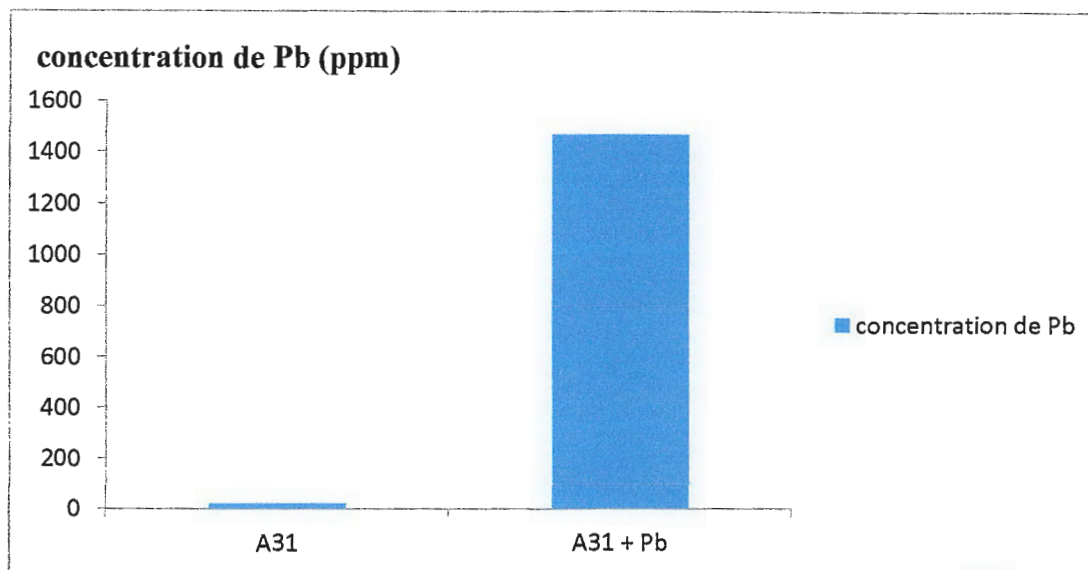
La **figure 11** représente la variation de la concentration du Pb extracellulaire au cours du temps en présence de *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>). Comme montré dans la **figure 11**, il y a une diminution rapide et remarquable de la concentration du Pb après 24 heures d'incubation, cette diminution continue jusqu'à 48 heures.



**Figure 11:** L'évolution de la concentration du Pb extracellulaire en fonction du temps en présence de *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>)

Le dosage par SAA du Pb intracellulaire (accumulé par *Bacillus megaterium* (A<sub>3</sub>1)) a donné les résultats présentés dans la **figure 12**. Cette figure montre qu'il y a une différence remarquable dans la concentration intracellulaire du Pb pour la bactérie cultivée dans un milieu dépourvu de Pb et l'autre cultivée en présence du Pb, où elle atteint 22,3332 ppm et 1467,16 ppm, respectivement. Donc *Bacillus megaterium* (A<sub>3</sub>1) est capable d'accumuler le Pb.

Le **tableau 11** représente les résultats de la concentration intracellulaire de Pb par rapport à un gramme de biomasse bactérienne humide.



**Figure 12 :** Bioaccumulation du plomb par *Bacillus megaterium* (A<sub>3</sub>1) après 48 h.

**Tableau 11:** la concentration intracellulaire du plomb.

Biomasse	Métal accumulé (mg/g de biomasse humide)
<i>Bacillus megaterium</i> (A <sub>3</sub> 1)	0.4
<i>Bacillus megaterium</i> (A <sub>3</sub> 1)+ Pb	21

Généralement les métaux lourds présentent un effet toxique sur de nombreuses espèces, en fonction de leurs concentrations, pour cette raison, les microorganismes ont pu développer des mécanismes pour la détoxification de ces derniers (Nanganuru et Korrapati, 2012). L'un de ces mécanismes est la biosorption, ce processus met en jeu des interactions ioniques aussi bien que la formation de complexes entre les cations métalliques et les groupements anioniques liés à la paroi cellulaire (Ziagova et al., 2007 ; Gabr et al., 2008).

Dans notre travail nous avons remarqué une augmentation de la concentration du Pb à l'intérieur des cellules de *Bacillus megaterium* (A<sub>3</sub>1) cultivées dans un milieu additionné de Pb



cette augmentation est parallèle à une diminution du Pb dans le milieu de culture, d'autre part, nous avons trouvé que 1g de biomasse humide accumule jusqu'à 21 mg du Pb.

Dans un travail similaire, **Sati et ses collaborateurs (2014)** ont trouvé que *B. megaterium* était capable d'accumuler jusqu'à 166.66 mg de Pb par un gramme de biomasse humide lorsque la souche est cultivée dans un milieu contenant 250 ppm.

De même, **Roane (1999)** a trouvé que *B. megaterium* accumule jusqu'à 50% du Pb sous forme de granules denses dans le cytoplasme dont la concentration initial de Pb était égale à 0.3 mM.

D'autres chercheurs ont étudié l'accumulation intracellulaire du Pb par des bactéries y compris *Bacillus* et *Pseudomonas*, ils ont montré que la bioaccumulation est plus favorable à fortes concentrations qu'à faibles concentrations (**Odu et al., 2012; Sati et al., 2014**).

**Zilgharnein et al (2010)** ont étudié l'absorption des métaux lourds par *Pseudomonas aeruginosa* MCCB 102, ils ont trouvé qu'il y a une forte accumulation de Cu, Zn, Cd et Pb (70.4, 65.9, 58.5, 42.8 mg/g de cellule sèche, respectivement), après analyse par le microscope électronique, ils ont montré qu'il y a des changements dans la surface des cellule après exposition à 1 mM pendant 4 jours, ils ont observé aussi qu'il y a une accumulation intracellulaire et dans le périplasma. Ces résultats suggèrent la présence de mécanismes de liaison de métal et/ou d'efflux dans la cellule ce qui fournit une résistance à la toxicité des métaux.

Selon **De Jaysankar et Vardanyan (2008)**, les bactéries éliminaient plus de 98% de Pb à moins de 96 h, dans le milieu de culture qui contenait une concentration initiale de métal de 100 ppm. L'efficacité de désintoxication du Pb indique un bon potentiel de leur application dans la biorestauration des métaux lourds toxiques.

Certain chercheurs ont mentionné que les micro-organismes y compris les bactéries, les champignons et les algues ont une forte affinité pour les métaux et peuvent accumuler des métaux lourds par une variété de mécanismes très efficaces dans la séquestration des métaux lourds. L'adsorption des métaux lourds, notamment le Pb par le biais du polymère extracellulaire des bactéries a été mise en évidence par microscope électronique à balayage (SEM) et spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS). Le premier mécanisme pour l'élimination des métaux lourds par les cellules bactériennes est la liaison du métal lourd cationique sur la surface des cellules bactérienne. Ces formes complexes ne sont généralement pas facilement transportées dans la cellule en raison de leur structure et de leur complexité. D'autre part, les cellules peuvent résister à certains ions métalliques en utilisant des pompes à efflux fonctionnant avec de l'énergie. Le troisième mécanisme de résistance est l'un des mécanismes les plus importants par lequel les bactéries contournent les métaux lourds il s'agit de l'accumulation intracellulaire (**Zilgharnein et al., 2010**).

Les résultats cités précédemment indiquent que *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) est capable d'accumuler le Pb ce qui suggère qu'il y a une affinité entre le métal et les cellules, celui-ci pourra être accumulé par divers mécanismes notamment la formation d'un complexe de métaux dans des systèmes biologiques ceux-ci comprennent l'accumulation dans les carbohydrates, les complexes protéiques polyphosphates ou une complexation avec les groupements carboxyle du peptidoglycane de la paroi cellulaire.

# *Conclusion*

## Conclusion

---

Ce travail a été réalisé dans le but d'exploiter les microorganismes dans la bioremédiation de l'environnement pollué par les métaux lourds qui ont une toxicité, cette pollution étant accentuée au cours des dernières décennies.

Notre expérience est fondue sur l'étude d'un processus intéressant pour la détoxification des métaux lourds qui est la bioaccumulation, dans notre cas effectué par les bactéries. Dans ce contexte, nous avons testé la résistance de deux bactéries qui sont *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) et *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) aux métaux lourds en plus, nous avons étudié leur capacité à accumuler un métal qui est le plomb.

Nos résultats indiquent que nos souches résistaient aux métaux testés (Fe, Pb, Cr, Hg), dont la concentration minimale inhibitrice du Hg et du Pb est égale à 50 mg/L pour *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et 380 mg/L pour *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>), respectivement. D'autre part, les résultats obtenus par test de bioaccumulation indiquent que *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) était capable d'accumuler une concentration remarquable du Pb équivalente à 21 mg/g.

Le test de l'antibiogramme montre que nos souches résistent la plupart des antibiotiques, ces résultats ouvrent des questions sur la présence d'une relation entre la résistance aux métaux lourds et celle aux antibiotiques, plusieurs mécanismes semblent communs.

D'après les résultats obtenus dans cette étude on peut conclure que *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) tolèrent les métaux lourds à forte concentration ce qui permet de les utiliser dans la biorémediation des sites pollués, par ces derniers, toutefois, d'autres études sont nécessaires pour comprendre le mécanisme de bioaccumulation mis en jeu notamment la recherche de gènes de résistance aux métaux lourds.

*Références  
bibliographiques*

**A**

**Abbas S. H., Ismail I. M., Mostafa T. M. et Sulaymon A. H.** (2014) (a). Biosorption of heavy metals. *Journal of Chemical Science and Technology*. 3(4):74-102.

**Abbas S. Z., Riaz M., Ramzan N., Zahid M. T., Shakoori F. R. et Rafatullah M.** (2014) (b). Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45 (4): 1309-1315.

**Abdul – Sada H. K.** (2009). A resistance study of *Pseudomonas aeruginosa* to heavy metals. *Basrah Journal of Veterinary research*. 8(2): 52 – 60.

**Ahmad M. et Malik A.** (2012). Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Bacteriology Journal*. 2 (1): 12 – 21.

**Akujobi C. O., Odu N. N. et Okorundu S. I.** (2012). Bioaccumulation of lead by *Bacillus* species isolated from pig waste. *Journal of Research in Biology*. 2: 83- 89.

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

**Antoniadis V. et McKinley J. D.** (2003). Measuring heavy metal migration rates in a low-permeability soil. *Environmental Chemistry Letters*. 1:103-106.

**Ao-Amer A. E., Abu-Gharbia M. A., Soltan E. S. M. et Abd El-Raheem W. M.** (2013). Isolation and molecular characterization of heavy metal resistant *Azotobacter chroococcum* from agricultural soil and their potential application in bioremediation. *Geomicrobiology Journal*. 31: 551-561.

**B**

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

**Bruins M. R., Kapil S. et Oehme F.** (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45: 198-207.

**C**

**Chang J. S., Law R. et Chang C. C.** (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*. 31(7): 1651-1658.

**Chojnacka K.** (2007). The application of biosorption and bioaccumulation of toxic metals in environmental pollution control. (In) *Hazardous materials and wastewater: treatment, removal and analysis*. (ed) Allison A. Lewinsky, pp. 309 - 359

**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 subtilis*. Brazilian Journal of Microbiology. 32: 1-5.

Costerton J. W., Lewandowski Z., Debeer D., Caldwell D., Korber D. et James G. 1994. Minireview: biofilms, the customized microniche. Journal of Bacteriology. 176: 2137-2142.

**Cloutier F., Jalby G., Lessard P. et Vanrolleghem P. A.** (2009). Modelisation dynamique du comportement des métaux lourds dans des stations d'épuration. Dynamic modelling of heavy metals behavior in wastewater treatment plants. Revue des Sciences de l'Eau. 22 (4): 461-471.

## **D**

**Das N., Vimala R. et Karthika P.** (2008). Biosorption of heavy metals: An Overview. Indian Journal of Biotechnology. 7: 159-169.

**De Jaysankar N. R. et Vardanyan L.** (2008). Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. Marine Biotechnology. 10: 471-477.

**Díaz S., Martín-González A. et Gutiérrez J. C.** (2006). Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. Environment International. 32: 711-717.

## **F**

**Flemming H. C., Wingende J. R., Moritz R., Borchard W. et Mayer C.** (1999). Physico-chemical properties of biofilms. Short review, Biofilms in the aquatic environment. (ed) The Royal Society of Chemistry. p:1-12.

## **G**

**Gabr R. M., Hassan S. H. A. et Shoreit A. A. M.** (2008). Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. International Biodeterioration and Biodegradation. 62(2): 195-203.

**Gadd G.M.** (1992). Metals and microorganisms: A problem of definition. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. 100: 197-204.

**Gaur N., Flora G., Yadav M. et Tiwari A.** (2013). A review with recent advancements on Bioremediation based abolition of heavy metals. Environmental Science: Processes and Impacts. 1-36.

**Gavrilescu M.** (2004). Removal of Heavy Metals from the environment by biosorption. Engineering in Life Sciences. 4(3): 219-232.

**Green-Ruiz C.** (2006). Mercury (II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary. Bioresource Technology. 97:1907-1911.

**Guo H., Luo S., Chen L., Xiao X., Xi Q., Wei W., Zeng G., Liu C., Wan Y., Chen J. et He Y.** (2010). Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp L14. *Bioresource Technology*. 101: 8599–8605.

## **H**

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

**Hamlett N.V., Landale E. C., Davis B. H. et Summers A. O.** (1992). Roles of the Tn21 merT, merP, and merC gene products in mercury resistance and mercury binding. *Journal of Bacteriology*. 174(20): 6377-6385.

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

**Hassen A., Saidi N., Cherif M. et Boudabous A.** (1998) (b). Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*. 65: 73-82.

**Hussein H., Farag S., Kandil K. et Moawad H.** (2005). Tolerance and uptake of heavy metals by *Pseudomonads*. *Process Biochemistry* 40: 955–961.

**Hussein H., Ibrahim S. F., Kandeel K. et Moawad H.** (2004). Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7(1):38-46.

## **I**

**Issazadeh K., Jahanpour N., Pourghorbanali F., Raeisi G. et Faekhondeh J.** (2013). Heavy metals resistance by bacterial strains. *Annals of Biological Research*. 4 (2):60-63.

## **J**

**Juwarkar A. A. et Yadav S. K.** (2010). Bioaccumulation and biotransformation of heavy metals. In: *Bioremediation Technology Recent Advances* (ed) Fulekar M. H. India. p 266- 284.

## **K**

**Kaimoussi A., Moozdahir 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 (1): 102–110.

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

**Kang C. H., Han S. H., Shin Y., Oh S. J. et So J. S.** (2013). Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172: 2907-2915.



**Kang C. H., Han S. H., Shin Y., Oh S. J. et So J. S.** (2013). Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172: 2907-2915.

**Kazy S. K., Sar P., Singh S. P., Sen A. K. et D'Souza S. F.** (2002). Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and a copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 583-588.

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

## **L**

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

**Llanos J., Capasso C., Parisi E., Prieur D. et Jeanthon C.** (2000). Susceptibility to heavy metals and cadmium accumulation in aerobic and anaerobic thermophilic microorganisms isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Current Microbiology*. 41: 201-205.

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

## **M**

**Machado M. D., Soares H. M. V. M. et Soares E.V.** (2010). Removal of chromium, copper, and nickel from an electroplating effluent using a flocculent brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Water Air Soil Pollution*. 212: 199-204.

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

**Mehta S. K., Singh A. et Gaur J. P.** (2002). Kinetics of adsorption and uptake of  $\text{Cu}^{2+}$  by *Chlorella vulgaris*: influence of pH, temperature, culture age, and cations. *Journal of Environmental Science and Health*. 37 (3): 399-414.

**Mclean R. J. C., Fortin D. et Brown D. A.** (1996). Microbial metal-binding mechanisms and their relation to nuclear waste disposal. *Revue canadienne de microbiologie*. 42 (4): 392-400.

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

**N**

- Nagashetti V. G. K. M., Muralidhar T. S., Javed A., Trivedi D. et Bhusal K. P.** (2013). Biosorption of Heavy Metals from Soil by *Pseudomonas Aeruginosa*. International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering. 2 (6): 22-24.
- Nanganuru H. Y. et Korrapati N.** (2012). Studies on biosorption of cadmium by *Pseudomonas putida*. Engineering Research and Applications. 2 (3): 2217-2219.
- Nakajima A. et Sakaguchi T.** (1986). Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnolog.* 24:59-64.
- Nies D. H.** (1999). Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology. 51: 730-750.
- Nikolaev Y. A. et Plakunov V.K.** (2007). Biofilm: “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms. Microbiology. 76 (2): 149-163.
- 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.
- Nourbakhsh M. N., Kiliçarslan S., İlhan S. et Ozdagb H.** (2002). Biosorption of Cr<sup>6+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions in industrial waste water on *Bacillus* sp. Chemical Engineering Journal. 85: 351-355.

**O**

- Odokuma L. O. et Akponah E.** (2010). Effect of concentration and contact time on heavy metal uptake by three bacterial isolates. Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology. 2 (6): 84-97.
- Odu N. N. et Akujobi C. O.** (2012). Lead bioaccumulation by *pseudomonas* species isolated from pig waste. Cancer Biology. 2 (2): 38 – 34.
- Oliveira A. D. S., Bocio A., Trevilato T. M. B., Takayanagu A. M. M., Domingo J. L. et Segura-Minoz S. I.** (2007). Heavy metals in untreated/treated urban effluent and sludge from a biological wastewater treatment plant. Environmental Science and Pollution Research. 14 (7): 483-489.
- Ogbonna C. E., Adinna E. N., Ugbogu O. C. et Otitoju O.** (2013). Heavy metal concentration and physicochemical properties of soil in the lead-zinc mining area of Ishiagu, Nigeria. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences. 3 (10): 61-69.
- Oves M., Khan M. S. et Zaidi A.** (2013). Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. Saudi Journal of Biological Sciences. 20:121-129.

### P

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

**Pazirandeh M., Wells B. M. et Ryan R. L.** (1998). Development of bacterium-based heavy metal biosorbents: enhanced uptake of cadmium and mercury by *Escherichia coli* expressing a metal binding motif. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10): 4068-4072.

### R

**Roane T.M.** (1999). Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal - contaminated soils. *Microbial Ecology*. 37: 218–224.

### S

**Sauge-Merle S., Cuiné S., Carrier P., Lecomte-Pradines C., Luu D. T. et Peltier G.** (2003). Enhanced toxic metal accumulation in engineered bacterial cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (1): 490-494.

**Sati M., Verma M. et Rai J. P. N.** (2014). Research article biosorption of Pb (II) ions from aqueous solution onto free and immobilized cells of *Bacillus megaterium*. *International Journal of Recent Scientific Research*. 5 (7): 1286-1292.

**Sen S. K., Raut S., Dora T. K. et Mohapatrab P. K. D.** (2013). Contribution of hot spring bacterial consortium in cadmium and lead bioremediation through quadratic programming model. *Journal of Hazardous Materials*. 11: 1-45.

**Sheng X. F., Xia J. J., Jiang C. Y., He L. Y. 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.

**Singh R., Paul D. et Jain R. K.** (2006). Biofilms: implications in Bioremediation. *Trends in Microbiology*. 14 (9): 389-397.

**Singh Y., Ramteke P. W., Tripathy A. et Shukla P. K.** (2013). Isolation and characterization of *Bacillus* resistant to multiple heavy metals. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2 (11): 525-530.

**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.

**Sutherland I. W.** (2001). The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*. 9: 222-227.

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

## T

**Teitsel G. M. et Parsek M. R.** (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (4): 2313-2320.

**Tchounwou P. B., Yedjou C. G., Patlolla A. K. et Sutton D. J.** (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. National Institutes of Health. 101: 133-164.

## V

**Valls M. et Lorenzo V.** (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. Federation of European Microbiological Societies *Microbiology*. 26: 327-338.

**Velusamy P., Awad Y. M., Abd El-Azeem S. A. M. et Ok Y. S.** (2011). Screening of heavy metal resistant bacteria isolated from hydrocarbon contaminated soil in Korea. *Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences*. 23 (1):40-43.

## W

**Wang G. et Chen C.** (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. 27: 195-226.

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

**Wang X., Sato T., Xing B. et Tao S.** (2005). Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish. *Science of the Total Environment*. 350 (1-3): 28 – 37.

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

## X

**Xu X., Zhao Y., Zhao X., Wang Y. et Deng W.** (2014). Sources of heavy metal pollution in agricultural soils of a rapidly industrializing area in the Yangtze Delta of China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 108:161-167.

**Xu Z., Lei Y. et Patel J.** (2010). Bioremediation of soluble heavy metals with recombinant *Caulobacter crescentus*. *Bioengineered Bugs*. 1(3): 207-212.

**Z**

**Ziagova M., Dimitriadis G., Aslanidou D., Papaioannou X., Tzannetaki E. L. et Liakopoulou-Kyriakides M.** (2007). Comparative study of Cd (II) and Cr (VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas sp.* in single and binary mixtures. *Bioresource Technology*. 98: 2859-2865.

**Zilgharnein H., Karami K., Assadi M. M. et Sohrab D.** (2010). Investigation of heavy metal biosorption on *Pseudomonas aeruginosa* strain MCCB 102 isolated from the Persian Gulf. *Asian Journal of Biotechnology*. 2 (2): 99 – 109.

# *Annexes*

**Annexe 1 : Evolution des souches bactériennes dans le bouillon nutritif additionné de 1 mg/L de métal**

*Pseudomonas sp. (S<sub>4</sub>)*

Métal Temps (h)	Fe	Pb	Hg	Cr
T = 0	0,037	0,035	0,026	0,036
T = 24	1,851	1,837	1,708	1,762
T = 48	2,602	2,178	2,45	2,644
T = 72	2,396	1,567	2,144	2,104

*Bacillus megaterium (A<sub>31</sub>)*

Métal Temps (h)	Fe	Pb	Hg	Cr
T <sub>0</sub>	0,033	0,04	0,027	0,044
T <sub>24</sub>	0,823	0,754	0,763	0,838
T <sub>48</sub>	1,255	3,042	1,171	2,494
T <sub>72</sub>	3,2	2,44	3,258	2,916

**Annexe 2 : Evolution des souches bactériennes dans le BN additionné de 10 mg/L de métal**

*Pseudomonas sp. (S<sub>4</sub>)*

Métal Temps (h)	Pb	Hg	Cr	Fe
T = 0	0.170	0.172	0.140	0.154
T = 24	3.178	3.582	2.854	3.168
T = 48	2.396	2.534	1.723	2.45
T = 72	1.141	1.262	1.183	1.441

*Bacillus megaterium (A<sub>31</sub>)*

Métal Temps (h)	Pb	Hg	Cr	Fe
T = 0	0.151	0.157	0.171	0.157
T = 24	1.409	2.478	0.752	1.017
T = 48	2.27	3.134	4.233	2.494
T = 72	1.576	1.107	1.337	1.324

**Annexe 3 :** Evolution de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) dans le bouillon nutritif en présence et en absence du Hg à 30 mg/L

Souche Temps(h)	<i>Pseudomonas</i> sp. (S <sub>4</sub> )	<i>Pseudomonas</i> sp. (S <sub>4</sub> ) + Hg
T <sub>0</sub>	0.045	0.035
T= 2	0.056	0.018
T = 4	0.244	0.018
T = 6	0.850	0.002
T = 24	2.291	1.571
T = 48	1.462	2.418

**Annexe 4 :** Evolution de *Bacillus megaterium* dans le bouillon nutritif en présence et en absence du Pb à 200 mg/L

Souche Temps(h)	<i>Bacillus</i> <i>megaterium</i> (A <sub>3</sub> 1)	<i>Bacillus</i> <i>megaterium</i> (A <sub>3</sub> 1) + Pb
T <sub>0</sub>	0.017	-0.112
T= 2	0.057	-0.100
T = 4	0.372	0.356
T = 6	0.867	0.727
T = 24	1.399	0.817
T = 48	1.674	1.754

**Annexe 5 :** La composition du bouillon nutritif (Biokar Diagnostics)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....10,0 g
- Extrait de viande .....5,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.



**Annexe 6 : Les résultats de la bioaccumulation du Pb**

Pb

	Action	Sample ID	True Value (ppm)	Conc. (ppm)	Abs.
2	STD	STD 1	0.5000		0.0089
3	STD	STD 2	1.0000		0.0163
4	STD	STD 3	2.0000		0.0296
5	STD	STD 4	5.0000		0.0700
6	STD	STD 5	10.0000		0.1324
7	STD	STD 6	20.0000		0.2542
82	UNK68	01		4.1254	0.0532
83	UNK69	02		3.2802	0.0423
84	UNK70	03		3.5283	0.0455
85	UNK71	04		5.4127	0.0698
86	UNK72	5D/1/100	,	3.6679	0.0473
87	UNK73	06		5.5833	0.0720
88	UNK74	07			
89	UNK75	08			
90	UNK76	09			
91	BLK	10			
92	UNK77	11			
93	UNK78	12			

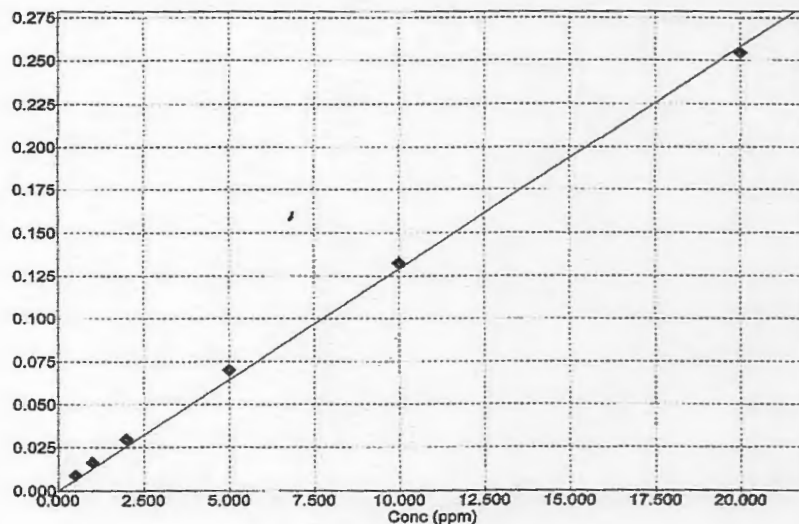
<b>01 et 02</b>	La concentration du Pb extracellulaire après 24 heures
<b>03 et 04</b>	La concentration du Pb extracellulaire après 48 heures
<b>05</b>	La concentration du Pb intracellulaire dans le milieu additionné du Pb à 200 mg/L après 48 heures
<b>06</b>	La concentration du Pb intracellulaire dans le milieu dépourvu du Pb après 48 heures

**Annexe 7 : La représentation de la concentration du Pb.**

**Annexe 8: Courbe d'étalonnage pour le dosage du Pb par SAA (flame C# : 01)**

mardi 2 juin 2015

Calibration Curve(Element:Pb:Flame C#:01)



Abs=0.0128957Conc+ 0 r=0.9998

CONC
0.5000
1.0000
2.0000
5.0000
10.0000
20.0000

ABS
0.0089
0.0163
0.0296
0.0700
0.1324
0.2542

<b>Présenté par :</b> Boubata Narimène Brahimi Besma	<b>Président :</b> Mr. Laib Essaid <b>Examinatrice :</b> M <sup>me</sup> Bourzama Ghania <b>Encadreur :</b> Dr. Ouled Haddar Houria
--	---

**Evaluation de la capacité de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) à accumuler certains métaux lourds**

**Résumé**

Au cours des dernières années, la pollution par les métaux lourds est devenue l'un des problèmes environnementaux les plus graves. Mercure, Fer, Plomb et Chrome sont la cause de perturbations chez les organismes vivants en particulier l'Homme. Les microorganismes essentiellement les bactéries ont la capacité de détoxifier ces contaminants par le mécanisme de la bioaccumulation.

L'objectif de ce travail est d'étudier la capacité de *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) et *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) d'accumuler ces métaux. Les résultats indiquent que ces derniers ont un degré de toxicité relativement faible sur les deux souches avec une CMI de 380mg/L de Pb pour *B. megaterium* (A<sub>31</sub>) et 50 mg/L de Hg pour *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>), d'autre part, les résultats du test de bioaccumulation révèlent que *B. megaterium* (A<sub>31</sub>) accumule une concentration de 21 mg de Pb/g de biomasse humide.

**Mots clés :** Métaux lourds, bactéries, la bioaccumulation, détoxifier, toxicité.

**Abstract**

In recent years, heavy metals pollution is one of the most serious environmental problems. Mercury, Iron, Lead and Chrome may cause disruptions to living organisms in particular human. Microorganisms namely bacteria have the ability to detoxify these contaminants by a mechanism called bioaccumulation.

The aim of this work is to study the capacity of *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) and *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) to accumulate these metals. The results indicate that they have a relatively low degree of toxicity on the two strains with an MIC of 380 mg/L of Pb for *B. megaterium* (A<sub>31</sub>) and 50mg/L of Hg for *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>), on the other hand, the results of bioaccumulation test revealed that *B. megaterium* (A<sub>31</sub>) accumulates a concentration of 21 mg of Pb/ g of wet biomasse.

**Key words:** Heavy metals, bacteria, bioaccumulation, detoxify, toxicity.

**المخلص**

في السنوات الأخيرة أصبح التلوث أكبر خطر مهدد للبيئة و هذا راجع إلى تراكم عدة ملوثات من بينها المعادن الثقيلة. الزئبق، الحديد، الرصاص والكروم تصنف ضمن العوامل المؤثرة سلبا على الكائنات الحية خاصة الإنسان. الأحياء الدقيقة كالبكتيريا لديها القدرة على نزع سمية هاته الأخيرة من خلال آلية تعرف بالتراكم الحيوي (التكدس).

الهدف من هذا العمل هو دراسة قدرة السلالتين البكتيريتين *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) و *Bacillus megaterium* (A<sub>31</sub>) على مقاومة سمية هذه المعادن. أظهرت النتائج أن *Pseudomonas* sp. (S<sub>4</sub>) تقاوم سمية الزئبق حتى التركيز المثبط الأدنى (CMI) يساوي 50 ملغ/ل فيما يصل تركيز الرصاص المقاوم من طرف *B. megaterium* (A<sub>31</sub>) إلى 380 ملغ/ل. ومن ناحية أخرى *B. megaterium* (A<sub>31</sub>) تكسب حتى 21 ملغ من الرصاص /غ من وزن الكتلة الحيوية الرطبة.

**الكلمات المفتاحية:** المعادن الثقيلة، البكتيريا، التكدس الخلوي، نزع السمية، السمية.