

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -

Université Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel -

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

et Sciences Alimentaires

جامعة محمد الصديق بن يحيى

كلية علوم الطبيعة والحياة

المكتبة

رقم الجرد : 2.4.2.6.....



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

**Elimination du chrome (VI) par *Bacillus megaterium*,
un hyperaccumulateur isolé de la boue activée de la
tannerie de Jijel**

Membres du Jury

Présidente : M^{me} Roula Sagia

Examineur: Mr. Laib Essaid

Encadreur : Dr. Ouled Haddar Houria

Présenté par :

Adjeroud Meriem

Taleb Rim

Année Universitaire 2015-2016

Numéro d'ordre (bibliothèque) :.....

REMERCIEMENTS

*Nous tenons à remercier en premier lieu, **Dr.Ouled Haddar Houria**, pour ses orientations, ces fructueux conseils et sa précieuse aide tout au long de ce travail, qu'elle veuille trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre gratitude pour avoir accepté de nous encadrer.*

Nous remercions également, les membres du jury qui ont accepté d'évaluer notre travail, et qui nous ont honorés de leur présence :

***M^{me} Roula Sagia**, chef du département de Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires, pour avoir voulu présider le jury et juger notre travail.*

***Mr. Laib Said**, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Sans oublier, un grand merci à tout le personnel du laboratoire de microbiologie, en particulier, pour leur aide et leurs disponibilités pendant toute la préparation de ce mémoire, et pour avoir mis à notre disposition toutes les conditions nécessaires. Nous avons eu beaucoup de plaisir à travailler avec chacun d'eux et leur exprimons toute notre gratitude pour l'aide et le respect qu'ils nous ont témoigné.

Enfin, nos vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

SOMMAIRE

Sommaire	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	IV
Liste des abréviations	V
Introduction	1
Partie bibliographique	
I. Chrome.....	3
I.1. Propriétés physico-chimiques du chrome.....	3
I.2. Réactions du chrome	3
I.2.1. Chrome hexavalent	3
I.2.2. Chrome trivalent	4
II. Chrome dans l'environnement.....	4
II.1. Dans le sol.....	6
II.2. Dans l'atmosphère.....	6
II.3. Dans l'eau et les aliments.....	6
III. Besoins et toxicité du chrome.....	7
III.1. Besoins essentiels	7
III.2. Toxicité du chrome	7
III.2.1. Chez l'homme et les animaux	7
III.2.2. Chez les végétaux	7
III.2.3. Chez les microorganismes	8
IV. Elimination du chrome	8
IV.1. Les techniques physico-chimiques	8
IV.2. Les techniques biologiques (bioremédiation).....	9
V. Résistance et réduction microbienne du chrome	9
V.1. Résistance au chrome	9
V.1.1. Mutation du système de transport du sulfate	10
V.1.2. Système d'efflux : la protéine ChrA	10
V.2. Réduction du Cr (VI) par les bactéries	11
V.2.1. Bactéries réductrices	11
V.2.2. Mécanisme de réduction du chrome	11
Matériel et méthodes	
I. Matériel	14

I.1. Matériel biologique	14
I.2. Milieux de culture	14
I.3. Produits chimiques et réactifs.....	14
I.4. Appareillage	15
II. Méthodes.....	15
II.1. Préparation de la solution mère de chrome (VI)	15
II.2. Préparation de l'inoculum bactérien	15
II.2.1. Mesure de la croissance bactérienne	16
II.3. Réalisation d'une courbe d'étalonnage pour la quantification de la biomasse microbienne	16
II.3.1. Calcul du taux de croissance bactérienne.....	16
II.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	17
II.5. Effet du chrome (VI) sur la croissance bactérienne	17
II.6. Elimination du chrome du milieu et bioaccumulation par la souche bactérienne	17
II.6.1. Méthodes colorimétriques de dosage du chrome (VI)	18
II.6.1.1. Préparation de la solution acide de diphénylcarbazine (DPC)	18
II.6.1.2. Établissement de la courbe d'étalonnage du chrome (VI).....	18
II.6.1.3. Mode opératoire.....	18
II.6.2. Calcul du taux de réduction du chrome (VI)	19
II.6.3. Lyse des cellules bactériennes.....	19
II.6.4. Détermination du poids sec	19
II.7. Essai enzymatique.....	20
II.7.1. Dosage des protéines totales.....	20
II.7.2. Dosage de l'activité chromate réductase	20
Résultats et discussion	
I. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	21
II. Effet du chrome (VI) sur la croissance bactérienne.....	23
III. Elimination du chrome (VI) du milieu de culture	25
IV. Bioaccumulation du chrome (VI) par la souche.....	28
V. Essai enzymatique	29
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Mécanisme de résistance aux ions CrO_4^{2-} par mutation du système de transport du sulfate. **10**
- Figure 2 :** Diagramme de réduction bactérienne du Cr (VI) (directe et indirecte). **12**
- Figure 3 :** Mécanismes de la réduction enzymatique du Cr (VI) dans des conditions aérobies et anaérobies. **13**
- Figure 4 :** Cinétique de croissance de *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence de différentes concentrations en Cr dans le bouillon nutritif à 37°C. **23**
- Figure 5 :** Evolution de la concentration du Cr (VI) dans le bouillon nutritif en fonction du temps et cinétique de croissance de *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence d'une concentration initiale en Cr de 30 mg/l. **26**
- Figure 6 :** Bioaccumulation du Cr par *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence de 30 mg/l de Cr dans le bouillon nutritif après 72h d'incubation à 37°C. **28**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Les principales caractéristiques physiques du chrome.	3
Tableau 2 :	Les Concentrations du chrome trouvé dans l'environnement et les limites recommandées dans les milieux et les organismes	5
Tableau 3 :	Les valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour la culture <i>Bacillus megaterium</i> (A3-1) en présence de concentrations croissantes de Cr à t0 et après 24h d'incubation à 37°C.	22
Tableau 4 :	Le taux de croissance de <i>Bacillus megaterium</i> (A3-1) en présence de différentes concentrations en Cr après 72h d'incubation à 37°C.	24
Tableau 5 :	Les valeurs des concentrations du Cr (VI) mesurée par spectrophotomètre au DPC aux temps t0, t24, t48, et t72.	25
Tableau 6 :	Le taux de réduction du Cr (VI) aux temps les temps t0, t24, t48 et t72h par la souche <i>Bacillus megaterium</i> (A3-1).	27
Tableau 7 :	Les concentrations intracellulaires du Cr (VI).	28
Tableau 8 :	Le dosage de l'activité chromate réductase aux temps t0, t24, t48 et t72.	29

LISTE DES ABREVIATIONS

BN	Bouillon nutritif
BSA	Bovin serum albumin
BSR	Bacterie sulfato-réductrice
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DO	Densité optique
DPC	Diphénylcarbazine
GN	Gélose nutritive
mn	Minute
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OMS	Organisation mondiale de la santé
pH	Potentiel d'hydrogène
ppm	Partie par million
rpm	Rotation par minute
UFC	Unité formant colonie

INTRODUCTION

I. Le chrome

I.1. Propriétés physico-chimiques du chrome

Le chrome est un métal blanc, brillant et non magnétique, il appartient au groupe (VI-B) de la classification périodique des éléments de transition (Shanker et al., 2005). Les principales caractéristiques physiques du chrome sont groupées dans le **tableau 1**.

Tableau 1: Les principales caractéristiques physiques du chrome (Mohanty et Patra, 2011).

Température de fusion	1857 °C
Température d'ébullition	2672°C
Densité	7,19 g/cm ³ -20°C
Isotopes naturels non radioactifs	50 (4,31%), 52 (83,76%), 53 (9,55%), 54 (2,38%)
Isotopes radioactifs	De 46 à 49, 51, 55 et 56

La spéciation du Cr(VI) et (III) dépend de plusieurs paramètres comme le pH, leur concentration. Selon le potentiel d'oxydoréduction et le pH dans le sol, le chrome peut exister dans quatre états, à savoir : deux formes trivalentes (Cr^{+3} et CrO_2^{-}) et deux formes hexavalentes ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ Et CrO_4^{-2}). Dans les milieux naturels, le chrome hexavalent est principalement sous la forme de CrO_4^{-2} et la majeure partie du chrome trivalent est incluse dans des hydroxydes ou dans des complexes avec des ligands organiques (Bradl, 2005).

I.2. Réactions du chrome

Le chrome est connu pour intervenir dans différentes réactions chimiques et biologiques qui peuvent modifier sa spéciation et par conséquent son comportement dans l'environnement. Il peut y avoir réduction du Cr(VI) ou oxydation du Cr (III) (Hellerich et al., 2008).

I.2.1. Le chrome hexavalent

Le chrome hexavalent est un oxydant puissant et peut être facilement réduit en présence d'un réducteur selon l'équation suivante :



Le Cr (VI), sous forme de chromate, peut oxyder la forme réduite de tous les couples dont le potentiel standard est inférieur à 1,195 V. Par conséquent, la réduction du Cr(VI) peut avoir lieu en conditions standards en présence de fer ferreux Fe(II), de composés soufrés réducteurs ou de matière organique telles que les acides fulviques et humiques. La réduction peut être aussi photochimique ou biologique (Losi et al., 1994).

I.2.2. Le chrome trivalent

Si la réduction du chrome hexavalent est possible dans l'environnement dans des conditions réductrices rencontrées dans de nombreux milieux peu oxygénés, l'oxydation du Cr (III) est moins courante car elle exige la présence d'un couple de potentiel redox plus élevé que celui de couple Cr (VI)/Cr (III). Cependant, les concentrations de Cr (III) en solution sont quasiment nulles dans les conditions environnementales courantes car le chrome trivalent précipite presque complètement sous forme de Cr(OH)₃. Le chrome trivalent ainsi immobilisé physiquement sur la matrice du sol ou bien sédimenté dans les milieux liquides est alors protégé de l'oxydation. A des pH < 5, le Cr (III) est présent sous sa forme cationique et peut s'adsorber sur des sites échangeurs de cations (Gurung et al., 2012).

L'oxydation du chrome trivalent peut avoir lieu en présence de l'oxygène, l'oxyde de manganèse ou être favorisée par la lumière (oxydation photochimique) (Pillai et Archana, 2012).

II. Le chrome dans l'environnement

Le chrome est présent dans l'environnement de manière ubiquiste. Sa présence peut être d'origine naturelle ou résultat de voies anthropiques, il se retrouve dans divers milieux environnementaux, à la surface comme dans les eaux souterraines, l'eau de mer, le sol et les sédiments et l'air. Le chrome a été découvert en 1797 dans un minerai de plomb rouge (crocoïte) en Sibérie par le chimiste français Nicholas Louis Vauquelin (Shanker et al., 2005).

Dans les systèmes aqueux, le chrome existe principalement dans deux états d'oxydation, à savoir : le chrome hexavalent (Cr VI) et le chrome trivalent (Cr III) (Tableau 2A).

La concentration du chrome dans les différents milieux environnementaux (sol, eau, air, et les organismes vivants), et les limites recommandées dans ces milieux et organismes sont présentés dans le tableau 2B.

Tableau 2: Les concentrations du chrome trouvé dans l'environnement et les limites recommandées dans les milieux et les organismes (Mohanty et Patra, 2011).

A. Limites des concentrations du chrome dans les milieux aqueux.

Utilisation de l'eau	Limites de concentration (mg/L)
Eau potable (Cr total)	0.05
Eau douce Cr (VI)	0.001
Cr (III)	0.008
Eau de mer Cr (VI)	0.001
Cr (III)	0.05
Eau d'irrigation Cr (VI)	0.008
Cr (III)	0.005
Eau d'abreuvement du bétail Cr (VI)	0.05
Cr (III)	0.05

B. Concentrations du chrome dans différents milieux environnementaux et organismes.

Origine de l'échantillon	Concentration du chrome total
Sol naturel	5-1000 mg/Kg
Eau fraîche	0-117 µg/L
Eau de mer	0-0.5µg/L
Air	100 ngm ³
Plantes	0.006-18 mg/kg
Animaux	0.03-1.6 mg/kg

Le chrome fut utilisé au début de XIX^{ème} siècle dans les procédés de pigmentation au bichromate. Aujourd'hui, il a trouvé un grand nombre d'applications industrielles qui exploitent ses couleurs mais aussi un grand nombre de ses autres qualités qui sont la solidité, la dureté et la résistance à la corrosion ainsi que les capacités oxydantes de certaines de ses formes. Il est très utilisé dans les industries métallurgiques et sidérurgiques pour la fabrication d'alliages ferreux et non ferreux. Ce métal est également utilisé dans l'industrie chimique sous forme de bichromate, comme mordant pour teintures et comme colorant sous forme de sels de chrome. Il est également employé sous forme de sulfate basique de chrome pour le tannage des peaux et des cuirs.

Le niveau de la production mondiale du chrome est de l'ordre de 10⁷ t /an. En 1998, le niveau de production se situait à 3,4 millions de tonnes. Il n'est pas surprenant compte tenu de toutes ses

qualités, que de grandes quantités de chrome soient utilisées dans différents procédés industriels et qu'en conséquence de grandes quantités de déchets chromés soient produites et éventuellement rejetées dans l'environnement (Mohanty et Patra, 2011).

II.1. Dans le sol

La concentration moyenne en chrome de la croûte continentale est de 125 mg/kg avec des valeurs généralement comprises entre 80 et 200 mg/kg (Losi et al., 1994).

Les principales réserves se situent en Afrique du Sud, en Turquie, en Iran, aux Philippines et en Finlande. La thermodynamique indique que le Cr (VI) peut exister de manière naturelle dans les sols. Bien que le Cr (VI) ne soit pas facilement adsorbé sur la plupart des surfaces, il est adsorbé par les minéraux argileux qui possèdent des groupes hydroxyles inorganiques exposés, y compris les oxydes de fer et d'aluminium (Losi et al., 1994).

II.2. Dans l'atmosphère

Le chrome hexavalent et ses composés peuvent être rejetés dans l'air comme sous-produits de la combustion de combustibles fossiles (pour la production d'électricité...) et de différents procédés industriels (fabrication de produits aéronautiques et de leurs pièces, usines de pâte à papier...) (Potgieter et al., 2003).

Le chrome atmosphérique est associé en majeure partie avec des matières particulaires, en raison d'événements naturels (érosion du sol et du roc, feux de forêt, volcan...) et d'activités humaines. Les teneurs en chrome dans l'atmosphère varient selon la localisation. Les concentrations moyennes dans les zones urbaines peuvent atteindre $0,03 \mu\text{g}/\text{m}^3$, valeurs largement dépassées dans des zones d'industrie de l'acier (Losi et al., 1994). Il est éliminé de l'atmosphère autant par les retombées sèches que par les précipitations humides. Le temps de séjour du chrome dans l'atmosphère est évalué à moins de 14 jours (Dalcin et al., 2011).

II.3. Dans l'eau et les aliments

Dans les systèmes aquatiques, les chromates ont une bonne solubilité, la toxicité des dérivés solubles du chrome varie en fonction de la température, du pH, de la dureté de l'eau ainsi que des espèces d'organismes aquatiques concernés.

La concentration maximale acceptable dans l'eau potable est de 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ selon l'OMS. Dans les eaux littorales, la contamination par le chrome est plus importante dans la phase particulaire que dans la phase dissoute. Les fleuves les moins contaminés présentent des concentrations en chrome dissous de l'ordre de 1 à 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Uysal, 2013).

III. Besoins et toxicité du chrome

III.1. Besoins essentiels

A l'état de trace, le chrome trivalent est un oligo-élément essentiel pour les êtres vivants. Il est nécessaire pour la synthèse des corps gras à partir du glucose et aussi pour l'oxydation des graisses en gaz carbonique. Il est nécessaire aussi pour la fonction propre de l'insuline, le principal effet biochimique de la déficience en chrome est la diminution de l'insuline (**Krishna et Philip, 2005; Thacker et al., 2007**).

III.2. Toxicité du chrome

Le chrome comme les autres métaux lourds est l'un des polluants les plus persistants dans l'environnement, sa présence dans l'air, le sol et l'eau est connue comme une source de menace croissante pour l'environnement et la santé humaine. A cause de sa solubilité, le chrome hexavalent, s'est trouvé en interaction avec beaucoup d'organismes aquatiques et terrestres sans oublier l'Homme (**Xu et al., 2014**).

III.2.1. Chez l'Homme et les animaux

En principe, l'Homme et l'animal absorbent peu le chrome par inhalation, mais l'essentiel passe à travers les aliments et l'eau potable. Les organes où la concentration en chrome est la plus élevée sont le foie, les reins, la rate et les os (**Kushwaha et al., 2012**).

La forme hexavalente n'est pas la source nutritionnelle car elle est très toxique et mutagène. La toxicité du chrome hexavalent vient de sa grande facilité à traverser les membranes biologiques et de ses propriétés oxydantes puissantes. A doses élevées, le chrome peut être responsable d'intoxications aiguës et chroniques. Il peut être absorbé par voie cutanée ou pulmonaire. Transporté par le sang, il s'accumule au niveau du foie, de l'utérus, des reins et des os. Il est éliminé par voie urinaire (**Polti et al., 2007**).

III.2.2. Chez les végétaux

Le chrome ne semble pas être essentiel à la vie des plantes (**Shanker et al., 2005**), sa toxicité vis à-vis du règne végétal est rare dans les systèmes naturels. Les effets toxiques du chrome chez les végétaux dépendent de la spéciation du métal, de la translocation et de l'accumulation du chrome (**Cervantes et al., 2001**).

Le transport de Cr (VI) est un mécanisme qui nécessite des transporteurs sous forme d'anions tel que le sulfate. L'accumulation du chrome au niveau des racines est grande en raison de son

immobilité au niveau des cellules des racines. À l'intérieur de la cellule, le Cr (VI) peut être réduit en Cr (III) qui va être retourné au niveau du cortex des cellules des racines à une concentration moins élevée par rapport à celle du Cr (VI) ce qui explique que le Cr (III) est moins toxique (Shanker et al., 2004).

III.2.3. Chez les microorganismes

Le chrome n'est pas un métal essentiel pour la croissance des microorganismes, mais sa présence peut être éventuellement tolérée par les microorganismes. Dans certains cas, l'élément peut être utilisé comme accepteur final d'électrons s'il s'agit du Cr (VI). A de fortes concentrations, le Cr (VI) a des effets toxiques et mutagènes ; 10 à 12 mg de Cr (VI) par litre peuvent inhiber le développement de bactéries du sol alors que les mêmes concentrations en Cr (III) n'ont aucun effet. Le chrome a un effet toxique sur les bactéries saprophytes et nitrifiantes, sur les champignons filamenteux, les algues et sur le phytoplancton. Le chrome (VI) altère le matériel cellulaire, le métabolisme et les réactions physiologiques (Thatoi et al., 2014).

IV. Elimination du chrome

Actuellement, le chrome fait partie des polluants les plus persistants dans l'environnement car il est non biodégradable. Cela a poussé les chercheurs pour développer des méthodes écologiques efficaces pour préserver et dépolluer la nature (Ali et al., 2013; Zakhama et al., 2011).

IV.1. Les techniques physico-chimiques

Plusieurs procédés ont été utilisés pour l'élimination et la récupération du chrome, on cite:

- Les procédés membranaires comme l'électro-osmose et la migration électrolytique (Pamukcu, 1992), la nanofiltration et l'ultrafiltration (Husnain et al., 2016) ;
- Les procédés chimiques comme la précipitation et la filtration membranaire (Gheju et al., 2016) ;
- Les procédés d'adsorption (Jain et al., 2010), l'échange d'ions et les résines dispécifiques (Li et Xue, 2001) ;
- Les procédés physiques comme le lavage du sol (Mulligan et al., 2001), la stabilisation (Dai et al., 2016) et l'immobilisation (Mench et al., 1999).

Généralement, ces méthodes présentent certains inconvénients comme (Abbas et al., 2014; Ali et al., 2013) :

- Les changements irréversibles des propriétés du sol et les perturbations de la microflore natale ;
- Le cout élevé lors du traitement d'une grande surface ou un grand volume d'eau usée ;
- Possibilité d'apparition d'autres problèmes comme la pollution secondaire.

Donc, au lieu de résoudre le problème, ces méthodes conventionnelles le décalent aux futures générations. Par contre, les techniques biologiques (bioremédiation et phytoremédiation) offrent une approche peu coûteuse et durable (**Kramer, 2005; Peuke et Rennenberg, 2005**).

IV.2. Les techniques biologiques (bioremédiation)

Dans la littérature, la bioremédiation provient de deux concepts : bio (vivants) et remédiation (guérison). Elle est définie comme un processus qui utilise les microorganismes, les enzymes ou les plantes pour traiter les sites pollués de l'environnement (**Ge et al., 2013**).

La pollution par les métaux lourds reste un défi majeur pour la biotechnologie environnementale. Ce dernier fait appel à des techniques efficaces, moins coûteuses et respectueuses de l'environnement. La bioremédiation consiste à utiliser des systèmes biologiques pour réduire le niveau de pollution présent dans l'air, l'eau ou le sol. Cela est réalisable via plusieurs méthodes comme : la biosorption, la bioaccumulation et la réduction enzymatique (**Haferburg et Kothe, 2007**).

Les techniques de bioremédiation peuvent être classées en méthodes *in situ* ou *ex situ*, si l'intervention est effectuée avec des bactéries appropriées, directement sur le site pollué, la méthode est dite *in situ*, lorsqu'elle est appliquée sur des parties de l'environnement, telles que l'eau, les sédiments ou le sol, après avoir été retirés et transportés dans des installations de traitement appropriées, la méthode est dite alors *ex situ* (**Monachese et al., 2012**).

V. Resistance et réduction microbienne du chrome

Dans les deux cas, le phénomène de résistance au chrome et les mécanismes de réduction du chrome par les micro-organismes, on parle du Cr (VI) qui est la forme la plus toxique et qui peut être éventuellement réduite.

V.1. Résistance au chrome

Pour résister au Cr (VI), il existe trois grandes stratégies (préventives ou bien curatives): empêcher le Cr (VI) d'entrer dans la cellule (mutation du système de transport du sulfate), le faire ressortir de la cellule s'il y entre (ChrA) ou le réduire en Cr (III) (**Ozturk et al., 2012**).

V.1.1. Mutation du système de transport du sulfate

La résistance aux chromates peut être due à une mutation chromosomique du système de transport du sulfate (Dhal et al., 2013). Les ions CrO_4^{2-} peuvent pénétrer dans les cellules par le même transporteur que les ions SO_4^{2-} : le sulfate perméase. En effet, les charges des deux ions sont les mêmes et l'encombrement stérique de même grandeur. Chez une cellule sauvage (non résistante), le système de transport du sulfate est fonctionnel. Par conséquent, les ions chromate peuvent pénétrer dans la cellule et perturber suffisamment le métabolisme. Dans ce cas, la bactérie aura un phénotype sensible. Lorsque le système de transport du sulfate est muté, les ions sulfate ne peuvent pas pénétrer, pas plus que les ions chromate qui ne peuvent donc pas endommager la cellule. Elle aura dans ce cas un phénotype résistant (Figure 1). Ce mécanisme de résistance a été décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Smith et al., 1995) et chez la bactérie *Streptomyces coelicolor* (Lydiate et al., 1988).

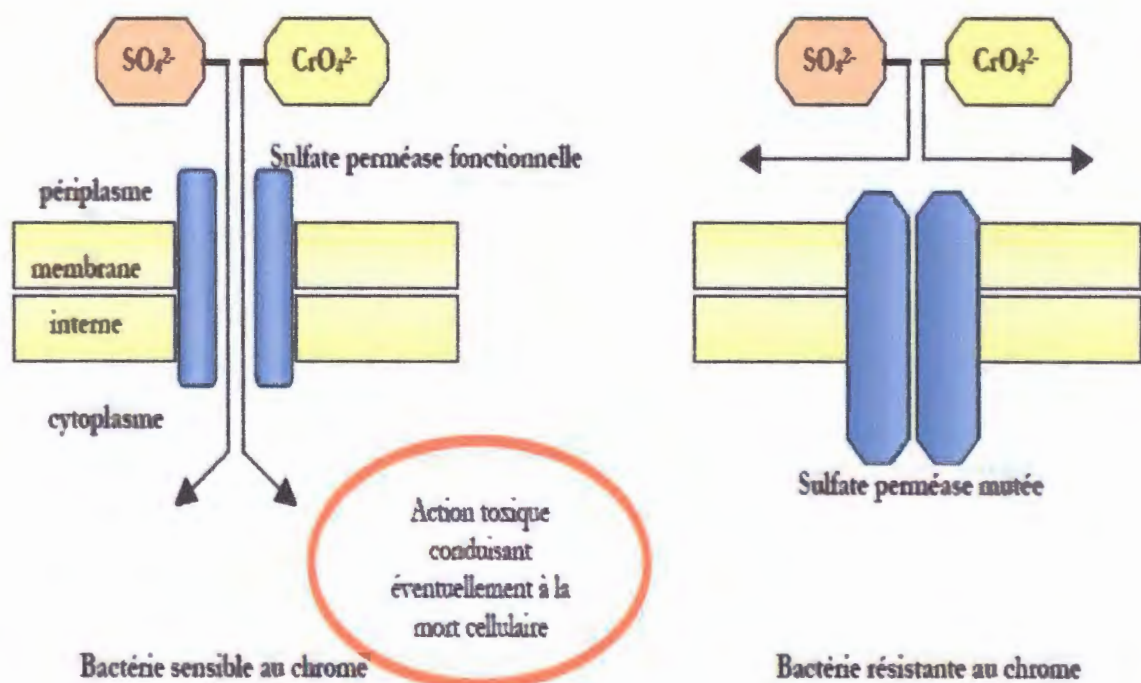


Figure 1 : Mécanisme de résistance aux ions CrO_4^{2-} par mutation du système de transport du sulfate (Thatoi et al., 2014).

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

La résistance au chrome chez plusieurs bactéries est liée à la présence d'un plasmide pARI180 chez *Pseudomonas mendocina* et pUM505 chez *Pseudomonas aeruginosa* (Dhakephalkar et al., 1996). L'analyse de la séquence du plasmide pUM505 a révélé un ORF

(Open Reading Frame) qui code un polypeptide appelé ChrA. Un ORF ou cadre de lecture ouvert est une séquence d'ADN susceptible de coder une protéine ou un polypeptide.

Des expériences sur *Pseudomonas aeruginosa* (Alvarez et al., 1999), ont montré que des vésicules formées à partir de cellules résistantes exprimant ChrA transportent plus de chromates que les vésicules formées à partir de cellules sensibles ne portant pas le gène chrA.

Cet efflux d'ions chromate par ChrA est inhibé par la présence d'ions sulfate suggérant que la protéine ChrA reconnaisse aussi SO_4^{2-} et qu'en excès le sulfate entre en compétition avec le chromate. La protéine ChrA expulserait les ions chromate en utilisant comme source d'énergie le potentiel de membrane. Il apparaît donc que ChrA serait une protéine d'efflux de la membrane qui permettrait de relarguer à l'extérieur les ions chromate (Alvarez et al., 1999).

V.2. Réduction du Cr (VI) par les bactéries

V.2.1. Bactéries réductrices

Plusieurs chercheurs se sont intéressés aux nombreuses bactéries capables de réduire le Cr (VI) et proposent des techniques utilisant ces bactéries réductrices de chrome pour le traitement des effluents liquides et plus récemment des sols pollués (Losi et al., 1994).

La résistance et la réduction du Cr(VI) peuvent se rencontrer chez les bactéries Gram négatif : *Providencia sp* (Thacker, 2006), *Serratia marcescens* (Campos, 2005), *Pseudomonas putida* (Ishibashi, 1990), *Thiobacillus ferrooxidans* (Sisti, 1996) et *Ochrobactrum intermedium CrT-1* (Faisal, 2005) et *Brucella sp* (Thacker, 2007), aussi bien que chez les Gram positif tel que *Bacillus cereus* S-6 (Faisal, 2005) et *Nesterenkonia sp MF2* (Amoozegar, 2007).

Certaines bactéries peuvent réduire le Cr (VI) en aérobiose : chez *Thermus scotoductus SA-01*, le chromate réductase est une protéine de 36 kDa qui utilise préférentiellement le NADPH comme accepteur final d'électrons (Opperman et al., 2008). D'autres peuvent la réaliser en anaérobiose c'est le cas de *Aerococcus sp* (Srinath et al., 2001).

V.2.2. Mécanisme de réduction du chrome

Si les déterminants génétiques de la résistance au chrome (gènes du système de transport du sulfate et gène de protéine d'efflux ChrA) sont assez bien connus, ceux de la réduction le sont beaucoup moins. Certains auteurs pensent que le déterminant est porté par un plasmide. Ce serait le cas pour *Pseudomonas mendocina* MCM B-180 (Dhakephalkar et al., 1996). Si les déterminants sont assez peu connus c'est aussi parce que les mécanismes de réduction du chrome sont nombreux et très diversifiés. Il peut s'agir d'une réduction directe (ou enzymatique), ou d'une réduction indirecte par l'intermédiaire de certains métabolites cellulaires (Figure 2).

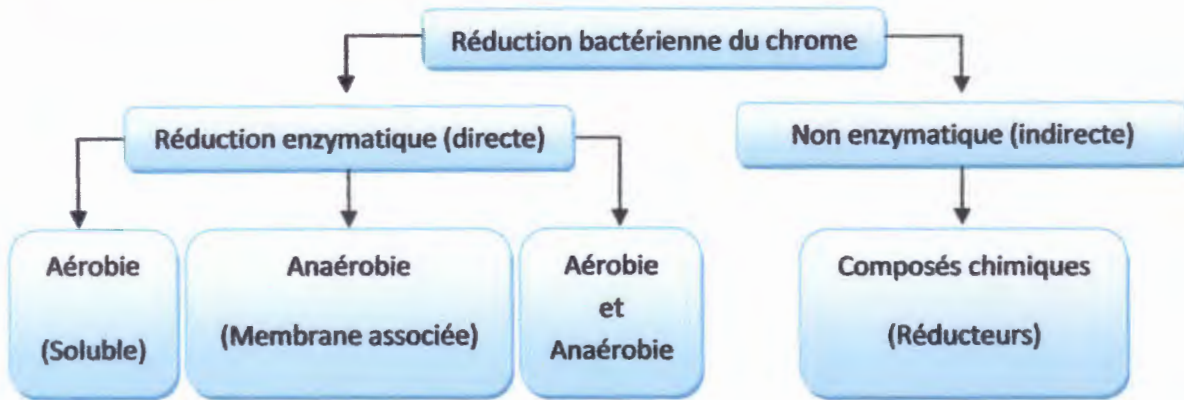


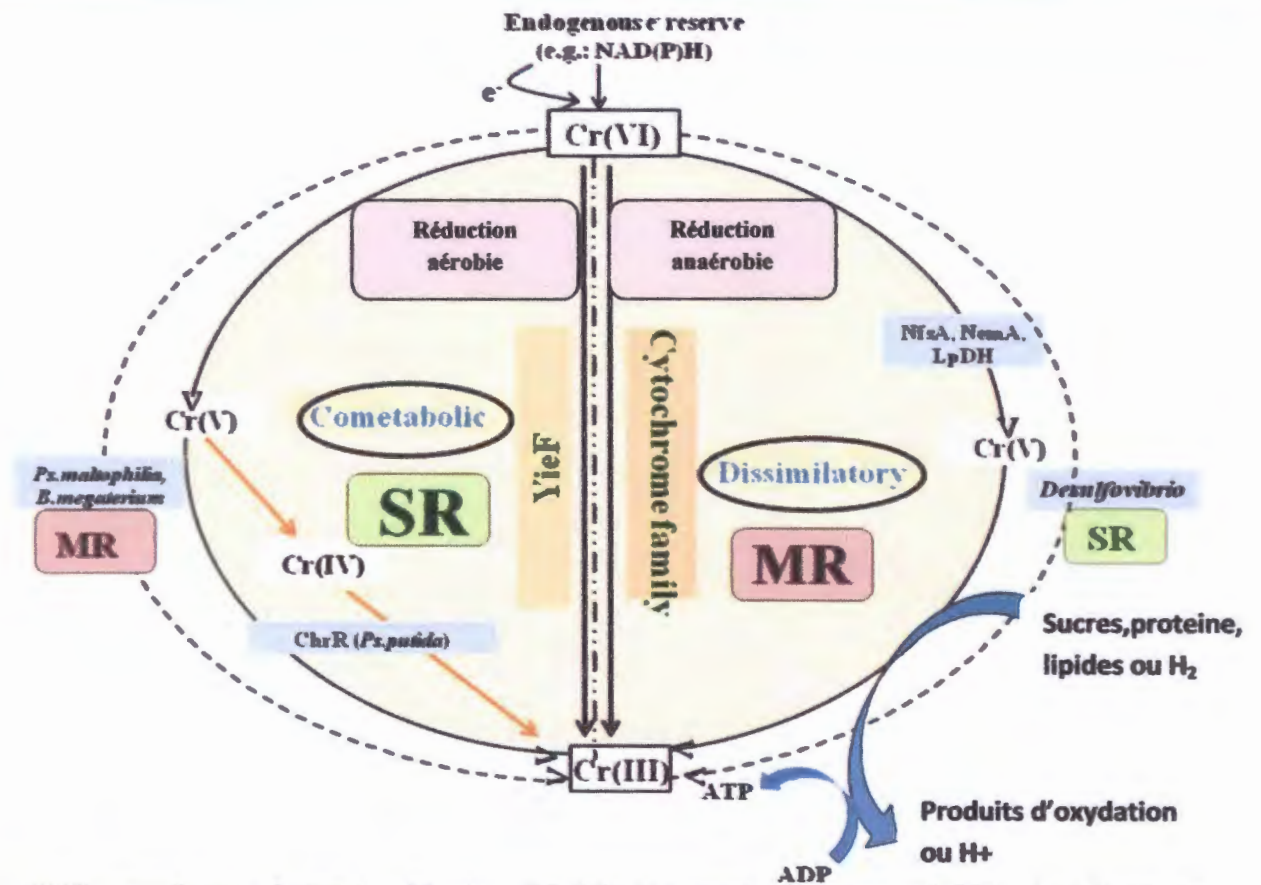
Figure 2 : Diagramme de réduction bactérienne du Cr (VI) (Das et al., 2014).

Il existe tout d'abord le cas particulier des bactéries sulfato-réductrices (BSR) qui réduisent le Cr(VI) avec de l' H_2S en condition anaérobie. L'hydrogénase permet d'oxyder H_2 en H^+ , les électrons cédés par l'hydrogène sont transférés au cytochrome C_3 qui les cède alors au Cr(VI) au lieu de réduire le sulfite (réduction indirecte).

Ensuite, chez d'autres micro-organismes, il existe la réduction du chrome dite directe car effectuée grâce à des protéines (solubles ou membranaires). Cette réduction peut s'effectuer en présence ou en absence d'oxygène. Ce type de réduction est aussi appelé réduction enzymatique. Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se déroulent rarement sans catalyseur. Ce dernier peut être un ion métallique ou une molécule plus complexe comme le NAD par exemple (Barrera-Díaz et al., 2012).

En présence d'oxygène, la réduction microbienne de Cr (VI) passe par deux ou trois étapes ; initialement il y a la réduction du Cr (VI) en Cr (V) et /ou Cr(IV) avant la réduction au chrome stable Cr (III). NADH, NADPH et les électrons de réserve endogène sont impliqués comme des donneurs d'électrons dans le processus de réduction de Cr (VI). L'enzyme chromate réductase (Chr) réduit le Cr (VI) avec un seul électron à Cr (V) suivi par le transfert de deux électrons pour produire le Cr(III).

L'enzyme YieF est une enzyme qui catalyse la réduction directe du Cr(VI) en Cr(III) (figure 3) (Thatoi et al., 2014).



(MR: membrane chromate réductase lié; SR: chromate réductase soluble) - Les lignes en pointillées représentent les cas de réduction exceptionnelles.

Figure 3 : Mécanismes de la réduction enzymatique du Cr (VI) dans des conditions aérobies (à gauche) et anaérobies (à droite) (Thatoi et al., 2014).

MATERIEL
ET
METHODES

MATERIEL ET METHODES

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, sur une période de 2 mois.

Ces expérimentations ont pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chrome (VI), pour la souche *Bacillus megaterium* (A3-1) en premier lieu, ensuite d'évaluer l'effet de différentes concentrations en chrome (VI) sur la croissance bactérienne de cette dernière, et enfin d'étudier le mécanisme d'élimination du chrome (VI) du milieu de culture par réduction enzymatique ainsi que le processus de la bioaccumulation du chrome (VI) par *Bacillus megaterium* (A3-1).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'élimination du chrome (VI) par *Bacillus megaterium* (A3-1), une souche bactérienne isolée des boues activées de la station d'épuration de la tannerie de Jijel, dans une perspective de bioremediation, qui peut représenter une alternative plus qu'intéressante aux méthodes physico-chimiques traditionnellement employées pour la dépollution des sites contaminés par le chrome (VI).

I. MATERIEL

I.1. Matériel biologique

La souche microbienne *Bacillus megaterium* (A3-1), utilisée dans cette étude, a été isolée à partir de la boue activée, en provenance du bassin d'aération, de la station d'épuration de la tannerie de Jijel. La pureté de la souche bactérienne (A3-1) a été vérifiée en la repiquant sur gélose nutritive pour l'obtention de colonies pures isolées.

I. 2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont :

- Bouillon nutritif déshydraté (BN) (**Annexe 1**)
- Gélose nutritive (GN) (Institut Pasteur)

I.3. Produits chimiques et réactifs

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

- Dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$)
- Acide sulfurique (H_2SO_4)
- 1-5 diphénylcarbazine ($C(NH)_4O(C_6H_5)_2$)
- Alcool éthylique à 95°
- Acide nitrique à 1%

- Tampon phosphate 0.1 M (pH 7) (**Annexe 2**)
- Réactif au bleu de Coomassie G250
- Albumine sérique bovine (BSA)

I.4. Appareillage

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

- Bec Bunsen
- Autoclave (Silli AVX electronic)
- Four pasteur (Mettler)
- Etuve 37°C (Mettler)
- Réfrigérateur (ENIEM)
- Spectrophotomètre optique (Jenway 7315)
- Bain marie agitateur (Mettler)
- Bain marie (Gerhardt Bonn)
- Incubateur agitateur (Infors HT Ecotron)
- Centrifugeuse (Hettich EBA 20)
- pH-mètre (Hanna)
- Balance électronique (Kern EMB600-2)
- Agitateur magnétique chauffant (Heidolph MR 3002)
- Vortex (VWR VV3)

II. METHODES

II.1. Préparation de la solution mère de chrome (VI)

Une solution mère de Cr (VI) a été préparée en solubilisant une quantité déterminée (2,83 g) de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) dans 1 L d'eau distillée de façon à obtenir une concentration en Cr égale à 1000 mg/L. Les autres concentrations étant obtenues par des dilutions successives (**Mahajan et Sud, 2013**).

II.2. Préparation de l'inoculum bactérien

La souche est préalablement activée dans du bouillon nutritif avant chaque expérience, et cela afin de travailler sur des cellules bactériennes viables. Pour ce, nous effectuons des prélèvements de colonies pures avec l'anse de platine, que nous incorporons dans des tubes à essai contenant 5ml de bouillon nutritif. Ces tubes sont par la suite incubés à 37°C sous agitation pendant 18 h.

II.2.1. Mesure de la croissance bactérienne

Pour évaluer la biomasse (ou quantité de matière vivante), la croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm en fonction du temps par un spectrophotomètre d'absorption moléculaire (UV-visible) (Singh et al., 2013; Xu et al., 2015; Zahoor et Rehman, 2009).

II.3. Réalisation d'une courbe d'étalonnage pour la quantification de la biomasse microbienne

L'estimation de la croissance bactérienne est faite par des numérations indirectes des cellules viables. Cette méthode permet l'appréciation des bactéries viables et cultivables. Après avoir effectué une série de dilutions décimales, la concentration cellulaire est déterminée par mesure de la DO à 600 nm avec un spectrophotomètre, suivi par un dénombrement sur boîte de Pétri.

Une aliquote (0,1 ml) des dilutions suivantes 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , et 10^{-9} (correspondantes aux DO de 0,035, 0,014, 0,003, et 0,001, respectivement), est étalée à la surface de la gélose nutritive. Après incubation à 37°C pendant 24h, et en tenant compte du facteur de dilution, nous pouvons déduire la concentration bactérienne initiale en unités formant colonies (UFC) par millilitre, selon la formule qui suit :

$$\text{UFC/ml} = n \times (1/d) \times (1/v) \text{ (Madigan et Martinko, 2007)}$$

n : nombre de colonies

d : dilution

v : volume

La courbe d'étalonnage est tracée en portant la DO à 600 nm en fonction du nombre d'UFC/ml (Annexe 3).

II.3.1. Calcul du taux de croissance bactérienne

Le taux de croissance bactérienne μ (h^{-1}) est calculé en utilisant l'équation suivante (Wei et al, 2009) :

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

DO_t : densité optique à un temps t

DO₀ : densité optique à un temps 0

T_t : temps apres incubation

T₀ : temps initial

II.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La méthode utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice en Cr (VI) est celle de dilution en milieu liquide de **Sukumar et al. 2013**, correspondant à une version modifiée du protocole de **Hassen et al. 1998**.

Suivant un gradient de concentration croissant en Cr (VI) (allant de 10 à 200 mg/L), une première série de tubes à essai d'un volume total de 10 ml, contenant du bouillon nutritif est préparée et à laquelle est additionné 1 ml de l'inoculum de *Bacillus megaterium* (dont la DO à 600 nm est égale à 0,1) préalablement activée. Avec en témoin, un tube ne contenant que le bouillon nutritif et l'inoculum. D'autre part, une deuxième série de tubes représentant un blanc pour chaque concentration est aussi préparée (sans l'inoculum). Les tubes sont ensuite incubés sous agitation à 37°C pendant 24h. La croissance bactérienne est suivie par la mesure de la DO à 600 nm à t0 et à t24.

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus petite concentration de Cr (VI) (exprimée en mg/L) capable d'inhiber la croissance de la bactérie.

II.5. Effet du chrome sur la croissance bactérienne

Dans des erlenmeyers de 250 ml stériles, la souche bactérienne (A3-1) préalablement activée a été inoculée à titre de 10 % dans 50 ml de bouillon nutritif en présence d'une concentration de 10, 20, 30, 40 et 50 mg/L en Cr (VI). Parallèlement, un témoin ne contenant que du bouillon nutritif et la culture, a aussi été préparé. Après une incubation à 37°C sous agitation, la DO à 600 nm a été mesurée pour chaque erlenmeyer aux temps t0, t1, t2, t3 et t4 pendant les premières 24h, puis aux temps t24, t48 et t72.

II.6. Elimination du Cr (VI) du milieu et bioaccumulation par la souche bactérienne

Dans un erlenmeyer de 250 ml stérile, on prépare un volume final de 100 ml constitué de bouillon nutritif, d'une concentration de 30 mg/L en Cr (VI), etensemencé par 10 % de la culture bactérienne (la DO de l'inoculum de départ à 600 nm est de : 1,7) préalablement activée (**Shakouri et al., 2000**).

Deux tests témoins sont préparés : Un 1^{er} dépourvu de culture bactérienne, et ce pour évaluer l'impact des facteurs abiotiques sur le devenir du chrome (**Bhattacharya et Gupta, 2013**). Un 2^{ème} dépourvu de Cr, cette fois-ci pour estimer la quantité de Cr intracellulaire initiale pour évaluer la bioaccumulation du Cr. Les erlenmeyers recouverts par le coton et du papier aluminium, sont ensuite incubés à 37°C sous agitation pendant une durée de 72h.

Afin de suivre l'évolution de la concentration du chrome dans le temps, des échantillons de 10 ml sont prélevés plusieurs fois en t₀, t₂₄, t₄₈ et t₇₂ dans des conditions d'asepsies. Les échantillons sont centrifugés pendant 20 minutes à 6000 rpm pour obtenir un surnageant exempt de cellules microbiennes.

Parallèlement, d'autres prélèvements sont effectués toutes les 24h pour suivre la cinétique de croissance de *Bacillus megaterium*, de la même manière que précédemment (II.2.1) et tout au long du test.

La mesure de la concentration de Cr (VI) a été effectuée selon la méthode colorimétrique standard de Greenberg et al., 1985. Le Cr (VI) de l'échantillon à analyser réagit avec un agent complexant, le 1,5-diphénylcarbazine en milieu acide. Ainsi, après 10 à 15 minutes, le complexe formé donne la couleur rose violacé dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en chrome hexavalent et est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm (Neibi et al., 2008).

II.6.1. Méthode colorimétrique de dosage du chrome (VI)

Le protocole de complexation et de réduction du chrome (VI) adopté est détaillé ci-dessous:

II.6.1.1. Préparation de la solution acide de diphénylcarbazine (DPC)

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

II.6.1.2. Etablissement de la courbe d'étalonnage du chrome (VI)

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

II.6.1.3. Mode opératoire

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

effectue les lectures au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm. Pour le blanc, un témoin a été préparé dans les mêmes conditions avec 50 ml d'eau distillée (Rodier et al., 2009).

A partir des valeurs de DO mesurées à 540 nm pour les solutions étalons, nous avons tracé la courbe d'étalonnage du chrome (Annexe 4), et les concentrations du Cr (VI) des échantillons sont calculées comme suit (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2008) :

$$C_f = C_0 \times F$$

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

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

F : facteur de dilution

II.6.2. Calcul du taux de réduction du chrome (VI)

Le taux de réduction du chrome est calculé en utilisant la formule suivante (Ozturk et al., 2012 ; Muthuraman et al., 2013; Sukumar et al., 2013) :

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

C_0 : concentration initiale du Cr (VI)

C_t : concentration du Cr (VI) en temps t

t : temps d'incubation.

II.6.3. Lyse des cellules bactériennes

A la fin des 72h d'incubation du test précédent, deux ultimes prélèvements de 5 ml sont réalisés, les deux échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 6000 rpm. Un 1^{er} tube à hémolyse servira pour la mesure du poids sec de la biomasse, après élimination du surnageant, et le 2^{ème} tube servira pour la lyse cellulaire. Le culot ainsi récolté est lavé trois fois avec l'eau déionisée et la lyse cellulaire est induite par l'addition de 5 ml d'acide nitrique à 1% avec un temps d'incubation de 24h à 4°C. Par la suite, le lysat bactérien est centrifugé pendant 10 mn à 6000 rpm, et le surnageant obtenu servira pour l'évaluation de la concentration intracellulaire du Cr (VI) accumulé.

La quantité de chrome accumulée est calculé et exprimé en : mg Cr/g du poids sec de la biomasse (Srinath et al., 2002).

II.6.4. Détermination du poids sec

Le tube à hémolyse contenant le culot est séché dans une étuve à environ 80°C puis pesé (2,9911 g). En déduisant le poids du tube vide pesé au préalable (2,9695 g), il ressort que le poids

sec de la biomasse est de 0,0216 g/5 ml du volume initial de la suspension cellulaire.

Donc, le poids sec en mg de biomasse/unité de volume est de : 4,320 mg/ml.

II.7. Essai enzymatique

II.7.1 Dosage des protéines totales

Les protéines sont dosées par la méthode de **Bradford, 1976**. Cette méthode est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. L'albumine sérique bovine (BSA) est la protéine standard utilisée pour la réalisation de la courbe d'étalonnage (**Annexe 5**).

II.7.2. Dosage de l'activité chromate réductase

Le mélange réactionnel pour l'essai enzymatique contient une concentration en Cr (VI) de 1 mg/L, dans 0,8 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7). Après 5 minutes de pré-incubation à 30°C, la réaction enzymatique est initiée par l'addition de 0,2 ml de l'enzyme (surnagent recueilli des prélèvements aux t0, t24, t48 et t72h lors du test **II.6**) et la réduction du Cr (VI) a été mesurée au bout de 30 minutes d'incubation. Le Cr (VI) est dosé par la méthode colorimétrique au 1,5 Diphenylcarbazine (**II.6.1**).

Un blanc est préparé avec les mêmes constituants mais qui est chauffé à 100 °C pendant 30 min pour éliminer l'activité réductrice.

Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui réduit 1 µmol/minute de Cr (VI) à 30°C (**Camargo et al., 2003**).

***RÉSULTATS
ET
DISCUSSION***

Résultats et discussion

Notre travail a concerné l'étude de l'élimination du Cr (VI) par la souche *Bacillus megaterium* (A3-1), en évaluant son degré de résistance au métal et par la suite sa capacité à le réduire du milieu de culture et à l'accumuler. Les résultats obtenus sont résumés et interprétés ici.

I. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en Cr (VI) est nécessaire pour l'étude de la croissance microbienne en présence du métal, car la bactérie ne se développera pas en présence de concentrations égales ou supérieures à cette CMI. Les résultats sont résumés dans le **tableau 3**.

Ces résultats montrent que la CMI du chrome pour *Bacillus megaterium* (A3-1) est égale à 80 mg/L, la bactérie résiste à des concentrations en métaux inférieures à cette valeur, mais peine à croître au-delà de cette valeur et commence à décroître à partir d'une concentration en Cr (VI) de 90 mg/l, qui s'avère être des concentrations létales car le Cr (VI) devient trop toxique pour la bactérie.

Des résultats similaires ont également été signalés par d'autres équipes de recherche, notamment **Srinath et al., 2002**, qui ont signalé que sur 71 souches microbiennes isolées des effluents de tannerie, dont *Bacillus megaterium* et *Bacillus circulans*, la majorité (55 souches) avaient une CMI comprise entre 51 et 100 mg/L, 5 souches seulement avaient une CMI inférieure à 100 mg/L, et 11 autres étaient capables de tolérer des concentrations supérieures à 100 mg/L de Cr (VI). **Farag et Zaki, 2010**, ont également remarqué que sur quatre souches du genre *Bacillus*, la croissance bactérienne de deux d'entre elles, était affectée après addition d'une concentration de 40 mg/L et 60 mg/L de chrome dans le milieu, alors que les deux autres résistaient et avaient une CMI de 160 mg/L et 200 mg/L.

Plusieurs travaux ont montré la résistance élevée au Cr des microorganismes isolés à partir des sites pollués. C'est le cas de la souche *Corynebacterium hoagii* qui résiste à des concentrations de 22 mM en Cr (**Viti et al., 2003**), et des souches *Bacillus sp.* JDM-2-1 et *Staphylococcus capitis* qui tolèrent jusqu'à 4800 µg/ml et 2800 µg/ml de Cr, respectivement (**Zahoor et Rehman, 2009**).

Egalement, la souche *Bacillus subtilis* SS-1 avec une CMI de 600 mg/L (**Sukumar et al., 2013**), et *Providencia sp* qui exhibait une CMI de 1000 mg/L (**Thacker et al., 2006**).

Cette variation de la valeur critique du Cr dépend des différentes conditions expérimentales, car différents paramètres peuvent fortement influencer les résultats tels que : le choix de la méthode de détermination de la CMI (milieu liquide, solide, ou avec des disques), la composition du milieu

de culture (pauvre ou enrichi), la nature du sel métallique utilisé, l'inoculum ensemencé et enfin l'espèce bactérienne étudiée ainsi que le milieu environnementale duquel elle a été isolée.

Tableau 3 : Les valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour la culture *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence de concentrations croissantes de Cr à t0 et après 24h d'incubation à 37°C.

[Cr] mg/L	DO à t0	DO à t24	DO (t24 - t0)
0	0,595	0,938	0,343
10	0,594	1,034	0,440
20	0,444	0,746	0,302
30	0,555	0,730	0,175
40	0,511	0,663	0,152
50	0,602	0,672	0,070
60	0,448	0,664	0,216
70	0,489	0,722	0,233
80	0,580	0,615	0,035
90	0,597	0,558	-0,039
100	0,582	0,551	-0,031
110	0,587	0,533	-0,054
120	0,546	0,539	-0,007
130	0,578	0,555	-0,023
140	0,572	0,532	-0,040
150	0,595	0,509	-0,086
160	0,627	0,533	-0,094
170	0,599	0,534	-0,065
180	0,611	0,543	-0,068
190	0,597	0,539	-0,058
200	0,613	0,542	-0,071

Ainsi, Hassen et al., 1998, avaient rapporté la différence entre les CMI de métaux lourds, déterminées pour des isolats effectués par deux tests visant à évaluer la mobilité des cations

De manière générale, il apparaît nettement qu'en absence du Cr dans le milieu de culture la croissance cellulaire évolue rapidement dès les premières heures d'incubation, la cinétique est plus forte et plus élevée qu'en présence du métal. On remarque également qu'en présence du Cr à des concentrations plus élevées allant jusqu'à la concentration de 30 mg/L, la souche se développe encore et les courbes de croissance ont globalement la même allure. Tandis que, la croissance microbienne devient plus faible et très perturbée pour des concentrations de 40 mg/L et 50 mg/L. Le développement des cultures bactériennes se déroule en plusieurs phases qui sont bien visibles en **figure 4**. A la phase de croissance initiale (les premières heures de cultures), succède la phase exponentielle de croissance pendant laquelle la division cellulaire se déroule plus rapidement et la physiologie bactérienne est très active. Suite à cette phase de croissance exponentielle, les cellules entrent en phase stationnaire. De ce fait, on note qu'en présence d'une certaine concentration en Cr de plus en plus élevée, les phases de latence sont plus longues de manière proportionnelle à cette concentration, correspondant probablement à un temps d'adaptation de la souche avec le métal présent en quantité élevée et à la préparation du matériel nécessaire pour tolérer et/ou résister au Cr.

Ainsi, **Singh et al., 2013**, qui ont étudié la courbe de croissance de *Bacillus cereus* ont montré que la phase de latence et la densité optique atteinte par la souche dépendent fortement de la concentration de Cr (VI) dans le milieu. Ils ont constaté que le Cr (VI) ne retarde pas de manière significative la croissance bactérienne jusqu'à 400 µg/ml. La croissance des cellules a été fortement influencée par le Cr (VI) à une concentration de 1200 µg/ml, tandis qu'à 600, 800 et 1000 µg/ml une faible influence sur la croissance a été constatée. La phase de latence était 12 h pour toutes les concentrations étudiées en dessous de 800 µg/ml. En présence de 1000 µg/ml, ils ont observé une phase de latence de 24 h et une phase stationnaire de la croissance pendant la période de 96 à 108 h.

Tableau 4 : Le taux de croissance de *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence de différentes concentrations en Cr (VI) après 72h d'incubation à 37°C.

	Taux de croissance bactérienne (h ⁻¹)
BN sans Cr	0,1932
BN + Cr 10 mg/L	0,1686
BN + Cr 20 mg/L	0,1784
BN + Cr 30 mg/L	0,1210
BN + Cr 40 mg/L	0,0662
BN + Cr 50 mg/L	0,0048



Nous pouvons aisément déduire d'après les différents taux de croissance de la souche, que la croissance bactérienne est plus élevée ($\mu=0,1932 \text{ h}^{-1}$) en absence de Cr dans le milieu de culture, et qu'elle baisse significativement au fur et à mesure que la concentration du métal augmente. Ainsi, nous notons que le taux de croissance de la souche bactérienne diminue de $0,1932 \text{ h}^{-1}$ dans le milieu exempt de Cr pour atteindre $0,0048 \text{ h}^{-1}$ quand le milieu est supplémenté de 50 mg/L en Cr.

Ces résultats sont en concordance avec ceux de Xu et al., 2015, qui indiquent que l'effet inhibiteur de Cr (VI) sur la croissance cellulaire augmente avec l'augmentation de la concentration du Cr (VI) de 12,5 à 125 mg/L pour *Bacillus anthracis* Cr-4. Une légère réduction de la croissance cellulaire est observée en présence de 12,5 mg/L et 25 mg/L en Cr (VI), alors qu'une réduction évidente de la croissance cellulaire est apparue en présence de 50 mg/L de Cr (VI), et la croissance cellulaire a été significativement inhibée par 100 mg/L et 125 mg/L de Cr (VI).

Les résultats de Zahoor et Rehman, 2009, qui ont étudié la courbe de croissance de *Bacillus* sp. JDM-2-1 et de *Staphylococcus capitis* en absence et en présence de 100 $\mu\text{g/ml}$ en Cr, montrent que pour la première souche aucune différence significative n'a été notée, en revanche pour la deuxième souche le taux de croissance est moins élevé en présence de Cr (VI).

III. Elimination du chrome (VI) du milieu de culture

Le but de ce test est d'étudier la capacité de *Bacillus megaterium* (A3-1) à réduire le Cr (VI) dans du bouillon nutritif, en présence d'une concentration initiale de 30 mg/L. L'élimination est suivie par la mesure de sa concentration dans le milieu de culture sur une durée de 72h, à raison d'une mesure toutes les 24h (Tableau 5). En parallèle à la cinétique de réduction du Cr (VI) dans le milieu, la cinétique de croissance bactérienne est également suivie par la mesure de la DO à 600 nm, tout au long du test (Figure 5). Le pourcentage de réduction final du Cr (VI) par la souche est calculé pour les temps t_0 , t_{24} , t_{48} et t_{72} (Tableau 6).

Tableau 5 : Les valeurs des concentrations du Cr (VI) mesurée aux temps t_0 , t_{24} , t_{48} , et t_{72} .

Temps	[Cr] + A3-1 (mg/L)	[Cr] Abiotique (mg/L)
t_0	29,433	29,500
t_{24}	27,021	28,980
t_{48}	2,413	28,660
t_{72}	0,000	29,050

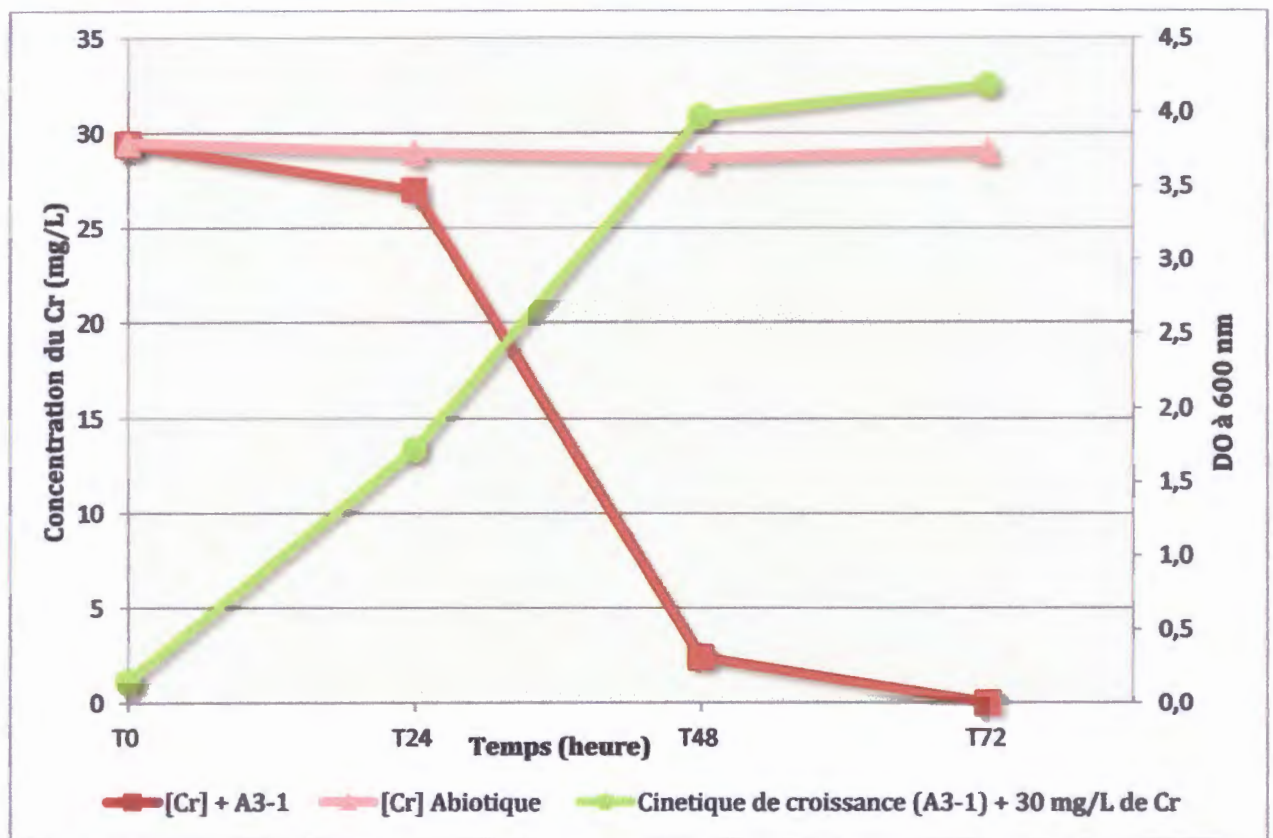


Figure 5 : Evolution de la concentration du Cr (VI) dans le bouillon nutritif en fonction du temps et cinétique de croissance de *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence d'une concentration initiale en Cr de 30 mg/L.

La vitesse de réduction du Cr (VI) est très lente entre t_0 et t_{24} , et une augmentation de la vitesse de réaction est clairement visible à partir de 24 h d'incubation, qui se stabilise et atteint le maximum de réduction de Cr (VI) au t_{72} . La réduction du chrome est d'autant plus importante quand la cinétique bactérienne de *Bacillus megaterium* (A3-1) entre dans la phase exponentielle de croissance. Quant au témoin, nous observons que la concentration du Cr reste à un niveau stationnaire et relativement inchangé.

Ces résultats indiquent que l'activité de réduction du Cr (VI) et la croissance bactérienne sont fortement liés et dépendent l'une de l'autre, il existe donc une corrélation entre ces deux processus (Xu et al., 2015). La croissance des cellules stimule une réduction efficace du Cr (VI) et la réduction à l'inverse favorise la croissance bactérienne. Cela peut être dû à la nature des bactéries résistantes au Cr (VI), qui créent un environnement réducteur pour détoxifier le Cr (VI) pour leur croissance. Très probablement, la croissance bactérienne et les dommages induits par Cr (VI) sont des processus en compétition, et les bactéries peuvent faire face à l'exposition au Cr (VI) aussi

longtemps que les sources en carbone métabolisables sont disponibles (Xu et al., 2009; Soni et al., 2012).

Tableau 6 : Le taux de réduction du Cr (VI) aux temps t0, t24, t48 et t72 par la souche *Bacillus megaterium* (A3-1).

	t0	t24	t48	t72
Taux de réduction du Cr (%)	1,89	9,93	91,956	100

Nous remarquons, que le pourcentage de réduction du chrome après 24 heures par le surnageant est seulement de 9,93 %, et arrive à environ 92 % au t 48 pour enfin atteindre les 100 % de réduction après 72h.

Concernant la réduction du Cr (VI) dans pratiquement les mêmes conditions expérimentales, il a été rapporté par Liu et al., 2006, que les souches *Bacillus sp. XW-2* et *Bacillus sp. XW-4* étaient capables d'éliminer séparément jusqu'à 100 % du Cr (VI) présent dans le milieu de culture avec une concentration initiale de 40 mg/L après 96 h d'incubation. De même, Shakoori et al., 2000, ont également signalé que la souche gram (+) CMB-Cr1 (ATCC 700729) pouvait réduire de 87 %, le Cr (VI) qui était à une concentration de 20 mg/L et cela après 72h.

D'autres souches bactériennes appartenant cette fois-ci au genre *Pseudomonas*, comme *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr et *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB91095, pouvaient éliminer respectivement 60 % en 35h (Ganguli et Tripathi, 1999) et 55 % en 72 h (Xu et al., 2009) du Cr (VI) pour une concentration initial de 40 mg/L.

Le taux d'élimination final du chrome (VI) et la durée nécessaire pour l'atteindre obtenus dans notre expérimentation, peuvent être considérés satisfaisants, comparés aux résultats cités auparavant.

Le Cr (VI) est complètement réduit en 72 heures dans les échantillons sans que la présence des cellules viables ne soit requise. Ces résultats indiquent que la ou les molécules responsable(s) de la réduction du chrome (VI) ne sont donc pas présentes uniquement dans les cellules. Il s'agit de molécules libérées dans le surnageant de culture. Nombre d'études et de travaux se sont intéressés à la localisation de l'activité réductrice. Selon les espèces bactériennes, l'activité chromate réductase peut être attribuée à une enzyme membranaire ou cytoplasmique.

longtemps que les sources en carbone métabolisables sont disponibles (Xu et al., 2009; Soni et al., 2013).

Tableau 6 : Le taux de réduction du Cr (VI) aux temps t0, t24, t48 et t72 par la souche *Bacillus megaterium* (A3-1).

	t0	t24	t48	t72
Taux de réduction du Cr (%)	1,89	9,93	91,956	100

Nous remarquons, que le pourcentage de réduction du chrome après 24 heures par le surnageant est seulement de 9,93 %, et arrive à environ 92 % au t 48 pour enfin atteindre les 100 % de réduction après 72h.

Concernant la réduction du Cr (VI) dans pratiquement les mêmes conditions expérimentales, il a été rapporté par Liu et al., 2006, que les souches *Bacillus sp. XW-2* et *Bacillus sp. XW-4* étaient capables d'éliminer séparément jusqu'à 100 % du Cr (VI) présent dans le milieu de culture avec une concentration initiale de 40 mg/L après 96 h d'incubation. De même, Shakoori et al., 2000, ont également signalé que la souche gram (+) CMB-Cr1 (ATCC 700729) pouvait réduire de 87 %, le Cr (VI) qui était à une concentration de 20 mg/L et cela après 72h.

D'autres souches bactériennes appartenant cette fois-ci au genre *Pseudomonas*, comme *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr et *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB91095, pouvaient éliminer respectivement 60 % en 35h (Ganguli et Tripathi, 1999) et 55 % en 72 h (Xu et al., 2009) du Cr (VI) pour une concentration initial de 40 mg/L.

Le taux d'élimination final du chrome (VI) et la durée nécessaire pour l'atteindre obtenus dans notre expérimentation, peuvent être considérés satisfaisants, comparés aux résultats cités auparavant.

Le Cr (VI) est complètement réduit en 72 heures dans les échantillons sans que la présence des cellules viables ne soit requise. Ces résultats indiquent que la ou les molécules responsable(s) de la réduction du chrome (VI) ne sont donc pas présentes uniquement dans les cellules. Il s'agit de molécules libérées dans le surnageant de culture. Nombre d'études et de travaux se sont intéressés à la localisation de l'activité réductrice. Selon les espèces bactériennes, l'activité chromate réductase peut être attribuée à une enzyme membranaire ou cytoplasmique.

IV. Bioaccumulation du chrome (VI)

Ce test nous a permis d'évaluer la capacité de *Bacillus megaterium* (A3-1) à accumuler le Cr (VI) après 72h d'incubation à 37°C en présence d'une concentration initiale de 30 mg/L en Cr (VI), en comparant avec le test témoin constitué d'une culture dans les mêmes conditions mais en absence de métal. Les résultats du test sont présentés ci-dessous dans la **figure 6** et le **tableau 7**.

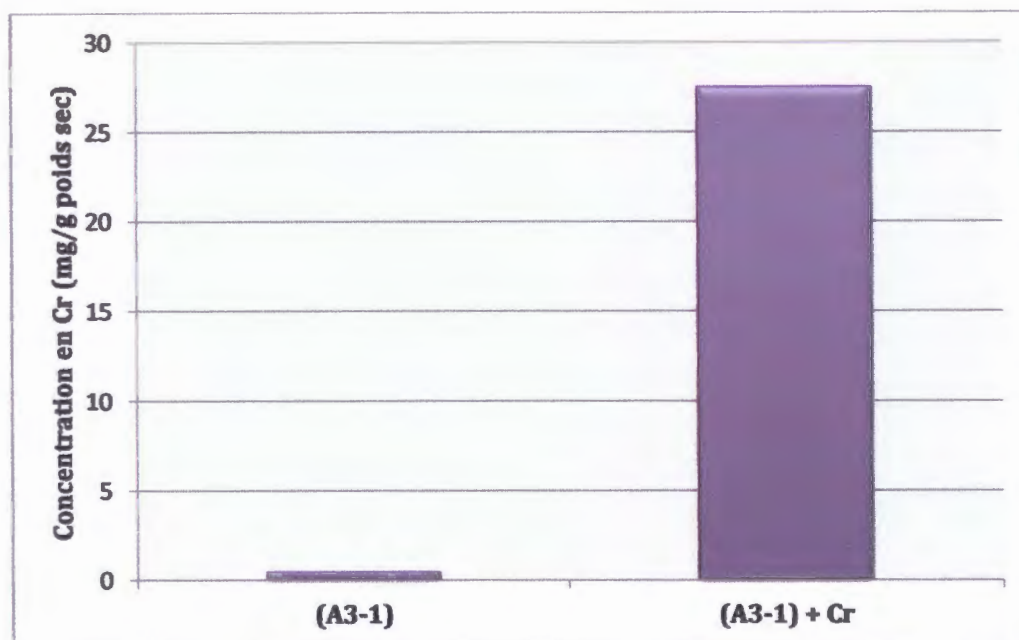


Figure 6 : Bioaccumulation du Cr par *Bacillus megaterium* (A3-1) en présence de 30 mg/L de Cr dans le bouillon nutritif après 72h d'incubation à 37°C.

Tableau 7 : Les concentrations intracellulaires du Cr (VI).

	Cr accumulé par la souche (mg/g du poids sec en biomasse)
<i>Bacillus megaterium</i> (A3-1)	0,483
<i>Bacillus megaterium</i> (A3-1) + Cr	27,50

Nos résultats sont proches de ceux des travaux de **Srinath et al., 2002**, selon lesquels la souche *Bacillus megaterium* présentait un taux de bioaccumulation de 32 mg/g de biomasse après 24h seulement, pour une concentration initiale en Cr (VI) de 50 mg/L. Alors que, la souche *Bacillus circulans* pouvait atteindre 34,5 mg/g de biomasse dans les mêmes conditions expérimentales.

Ces mêmes auteurs ont étudié la biosorption du Cr (VI) à une concentration initiale de 100 mg/L par *B. coagulans* et *B. megaterium*, en utilisant des cellules vivantes puis des cellules mortes. Il a été démontré que la biosorption par les cellules mortes était supérieure à celle des cellules

vivantes. Avec des cellules vivantes, était accumulé 23,8 et 15,7 mg Cr/g de poids sec en biomasse de *B. coagulans* et *B. megaterium*; respectivement, alors qu'avec des cellules mortes, 39,9 et 30,7 mg Cr/g de poids sec ont été accumulés par *B. coagulans* et *B. megaterium*, respectivement.

V. Essai enzymatique

Pour ce dernier test, il est nécessaire de connaître la concentration de l'ensemble des protéines contenues dans les surnageants recueillis à partir des échantillons prélevés aux temps t0, t24, t48 et t72 dans le test II.6. Ensuite, nous avons mesuré la concentration du Cr (VI) dans le mélange réactionnel après 30 mn d'incubation à 30°C, et ainsi calculé l'activité enzymatique (Tableau 8).

Tableau 8 : Dosage de l'activité chromate réductase aux temps t0, t24, t48 et t72.

	t0	t24	t48	t72
Concentration en protéines initiales (g/l)	0,051	0,064	0,111	0,199
Activité enzymatique (unité)	0,0224	0,3314	0,6410	0,6410
Activité spécifique (Unité/mg protéines)	0,0004	0,0052	0,0058	0,0032

D'après ces résultats, nous notons que la concentration des protéines totales a augmenté en fonction du temps, du fait de la croissance bactérienne de *Bacillus megaterium* (A3-1) et de l'augmentation de production de toutes sortes de molécules nécessaires à la division cellulaire et à son développement.

De plus, nous pouvons déduire que l'activité enzymatique ainsi que l'activité spécifique dans les surnageants prélevés augmente sensiblement, pour atteindre un pic au temps t48.

Camargo et al., 2003, ont comparé l'activité chromate réductase de cinq souches bactériennes isolées du sol ES 04, ES 23, ES 29, ES 32 et ES 39. Les extraits exempts de cellules (fraction cytosolique) testés ont présenté une activité chromate réductase entre 0,38 et 0,48 unité /mg de protéine. Il s'est avéré que la souche ES 29 et ES04 présentaient un taux de réduction du Cr (VI) de 81,2% et 79,5%, respectivement. Dans une autre étude de Soni et al., 2013, la mesure de l'activité enzymatique était de $0,32 \pm 0,109$, $0,42 \pm 0,098$, $0,34 \pm 0,080$ et $0,28 \pm 0,150$ $\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine pour les fractions cytosolique des souches *Bacillus sp.* (JN674188), *Microbacterium sp.* (JN674183), *Bacillus thuringiensis* (JN674184), et *Bacillus subtilis* (JN674195), respectivement, ce qui confirme la présence d'enzymes solubles dans la fraction cytosolique, considérant qu'elle a pu

être libérée dans le milieu extracellulaire par les souches pendant les premières 48 heures de leur croissance.

Les activités chromate réductases décrites jusqu'à présent en aérobiose sont localisées, pour l'immense majorité, dans la fraction soluble. Il existe deux souches pour lesquelles le mécanisme de réduction directe en condition aérobie a été plus précisément décrit. Il s'agit des souches de *Pseudomonas ambigua* G-1 et de *Pseudomonas putida* MK1. L'activité chromate réductase des deux souches est contenue dans la fraction soluble. Chez *P. ambigua*, l'enzyme serait une protéine de 65 kilodaltons (kDa). Cette enzyme fonctionne dans une gamme de températures et de pH assez large (40-70°C, optimale : 50°C ; pH 6-9, optimal : 8,6). Cette enzyme permet la réaction de réduction du chrome en présence de NADH ou de NADPH et la réduction de 1 mole CrO_4^{2-} nécessite l'utilisation de 3 moles de NADH qui sont oxydées en NAD^+ (Thatoi et al., 2014).

Les processus par lesquels les micro-organismes interagissent avec les métaux lourds pour réduire leurs toxicités sont la biosorption, la bioaccumulation et la réduction enzymatique. La réduction du Cr (VI) en Cr (III) par traitement biologique serait une approche rentable pour l'élimination du Cr (VI). Un certain nombre d'études ont démontré la bioremediation utilisant des cellules entières. Cependant, seules quelques études ont démontré une réduction *in vitro* par des enzymes microbiennes (Cervantes et al., 2001). L'utilisation d'enzymes a des avantages, car contrairement à ces dernières, elles ne sont pas affectées par les inhibiteurs de croissance microbienne, les toxines, les prédateurs ou la compétition microbienne dans l'environnement. De plus, les enzymes peuvent être immobilisées dans des réacteurs pour l'élimination de chrome (Camargo et al., 2003).

En vue des résultats obtenus dans cette étude, il apparaît que la souche *Bacillus megaterium* (A3-1) n'est pas seulement capable de se développer et de résister dans un bouillon nutritif additionné de 30 mg/L en Cr (VI), mais elle montre une aptitude remarquable à bioaccumuler ce métal et encore mieux à le réduire totalement du milieu de culture au bout de 72h d'incubation à 37°C. Ces propriétés lui confère donc un statut de dépolluant potentiel, pouvant être utilisée pour la biorémediation du Cr (VI), et ainsi de traiter les sites pollués de manière plus efficace, moins coûteuse et plus saine pour l'environnement.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'évaluer la résistance de la souche *Bacillus megaterium* (A3-1), isolée à partir de la boue activée de la tannerie de Jijel, et d'étudier sa capacité à éliminer le Cr (VI) présent à une concentration de 30 mg/L dans le milieu de culture.

Dans un premier temps, la concentration minimale inhibitrice du chrome a été estimée à 80 mg/L, puis l'effet de différentes concentrations en chrome sur la croissance bactérienne a été évalué. Dans le second temps, l'élimination du chrome (VI) par la souche *Bacillus megaterium* (A3-1) a été étudiée en mettant en œuvre son analyse par spectrophotométrie au 1,5 diphénylcarbazine. Dans les conditions expérimentales qui sont une concentration initiale en Cr (VI) égale à 30 mg/L et une incubation d'une période de 72 h à 37°C sous agitation modérée, il en ressort que *Bacillus megaterium* atteint les 100 % d'élimination du Cr (VI), la réduction par l'activité chromate réductase étant confirmée par l'essai enzymatique et une capacité de bioaccumulation de 27,50 mg/g du poids sec en biomasse.

Par conséquent, compte tenu de l'ensemble des résultats fournis par cette étude, la souche *Bacillus megaterium* (A3-1) pourrait être considérée comme un matériau biologique assez prometteur pour être utilisé en tant que dépolluant efficace pour l'élimination du chrome (VI) présent dans les effluents liquides de tannerie. Ce procédé est peu coûteux, du fait de la disponibilité de la souche sur site et de son renouvellement perpétuel, comparé aux coûts relativement élevés des techniques de dépollution physico-chimiques.

Cependant, afin de fiabiliser nos résultats, il serait judicieux de compléter ce travail par une étude plus approfondie des différents paramètres pouvant influencer sur la réduction du chrome (VI), et notamment celle de l'influence des différentes conditions physico-chimiques telles que le pH, la quantité de biomasse à inoculer, la concentration du métal initial, la température et le mode respiratoire, et cela afin de montrer l'influence de chaque paramètre indépendamment et de leurs dépendances.

Dans la perspective qu'un jour nous puissions mettre en œuvre ces résultats et les exploiter dans le traitement biologique des effluents de tannerie, la compréhension des mécanismes qui régissent le processus de réduction du chrome (VI) par des bactéries résistantes au Cr (VI), est d'une immense importance. Il est également nécessaire de déterminer le mécanisme sous-jacent à la résistance et à isoler et à caractériser les enzymes et les gènes impliqués dans la réduction du chrome hexavalent.

***RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES***

A

- Abbas S H, Ismail I M, Mostafa T et Sulaymon A.** 2014. Biosorption of heavy metals : a review. *Journal of Chemical Science and Technology.* 3 (4): 74-102.
- Aboulhassan M A, Souabi S, Yaacoubi A, Zaim N et Bouthir F Z.** 2008. Les effluents de tannerie caractérisation et impact sur le milieu marin. *Revue des Sciences de l'Eau.* 21(4) : 463-464.
- Ali H, Khan E et Sajad M A.** 2013. Phytoremediation of heavy metals : concepts and applications. *Chemosphere.* 91 (7): 869-881.
- Alvarez A H, Sanchez R M et Cervantes C.** 1999. Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology.* 181(23): 7398-7400.
- Amoozegar M A, Ghasemi A, Razavi M R et Naddaf S.** 2007. Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile *Nesterenkonia* sp MF2. *Process Biochemistry.* 42 (10): 1475-1479.

B

- Bajza E, Hitrec P et Muic M.** 2004. Influence of different concentrations of $Al_2(SO_4)_3$ and anionic polyelectrolytes on tannery wastewater flocculation. *Desalination.* 171: 13-20.
- Barrera-Díaz C E, Lugo-Lugo V et Bilyeu B.** 2012. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr (VI) reduction. *Journal of Hazardous Materials.* 223-224 :1-12.
- 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 (9): 6628-6637.
- Bradford M M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72 (1-2): 248-254.
- Bradl H.** 2005. Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation. Elsevier Academic Press. 6 (270): 0-12-088381-3.

C

- Camargo F A O, Okeke B C, Bento F M et Frankenberger W T.** 2003. In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp ES 29 stimulated by Cu^{2+} . *Applied Microbiology and Biotechnology.* 62 (5-6): 569-573.

Campos V L, Moraga R , Ya´nez J , Zaror C A et Mondaca M A. 2005. Chromate reduction by *Serratia marcescens* isolated from tannery effluent. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 75 (2): 400–406.

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

Cervantes C, Campos-Garcia J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H et Torres-Guzman J et Moreno-Sanchez R. 2001. Interactions of chromium with micro-organisms and plants. *FEMS Microbiology Review*. 25 (3): 335-347.

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.

Cheung K H et Gu J D. 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59: 8–15.

D

Dantas Neto A A, de Castro Dantas T N et Alencar Moura M C P. 2004. Evaluation and optimization of chromium removal from tannery effluent by microemulsion in the Morris extractor. *Journal of Hazardous Materials*. 114: 115–122.

Dai Y , Hu Y, Jiang B, Zou J, Tian G et Fu H. 2016. Carbothermal synthesis of ordered mesoporous carbon-supported nano zero-valent iron with enhanced stability and activity for hexavalent chromium reduction. *Journal of Hazardous Materials*. 309: 249-258.

Dalcin M, Pirete M M, Lemos D A, Ribeiro E J, Cardoso V L et de Resende M M. 2011. Evaluation of hexavalent chromium removal in a continuous biological filter with the use of central composite design (CCD). *Journal of Environmental Management*. 92 (4): 1165-1173.

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

Dhakephalkar P, Bhide V et Paknikar K. 1996. Plasmid mediated chromate resistance and reduction in *Pseudomonas mendocina* MCM B-180. *Biotechnology Letters*. 18: 1119-1122.

Dhal B, Abhilash et Pandey B D. 2013. Process optimization for bio-beneficiation of a chromite concentrates by a Cr (VI) reducing native microbe (*Bacillus* sp). *International Journal of Mineral Processing*. 123: 129–136.

F

Faisal M, Hameed A et Hasnain S. 2005. Chromium-resistant bacteria and cyanobacteria: impact on Cr (VI) reduction potential and plant growth. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32: 615–621.

Farag S et Zaki S. 2010. Identification of bacterial strains from tannery effluent and reduction of hexavalent chromium. *Journal of Environmental Biology*. 31 (5): 877-882.

G

Ganguli A et Tripathi A K. 1999. Survival and chromate reducing ability of *Pseudomonas aeruginosa* in industrial effluents. *Applied Microbiology*. 28: 76–80.

Ge S, Xinjiao D, Jiangmin Z et Shichao D. 2013. Comparative evaluations on bio-treatment of hexavalent chromate by resting cells of *Pseudochrobactrium* sp and *Proteus* sp In wastewater. *Journal of Environmental Management*. 126: 7-12.

Gheju M, Balcu I, Vancea C. 2016. An investigation of Cr (VI) removal with metallic iron in the copresence of sand and/or MnO₂. *Journal of Environmental Management*. 170: 145-151.

Gurung A, Oh S E, Kim K D, Shin B S. 2012. Semi-continuous detection of toxic hexavalent chromium using a sulfur-oxidizing bacteria biosensor. *Journal of Environmental Management*. 106: 110-112.

H

Haferburg G et Kothe E. 2007. Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology*. 47 (6): 453-467.

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

Hellerich L A, Nikolaidis N P et Dobbs G M. 2008. Evaluation of the potential for the natural attenuation of hexavalent chromium within a sub-wetland ground water. *Journal of Environmental Management*. 88: 1513–1524.

Husnain A, Qazi I A, Khaliq W et Arshad M. 2016. Immobilization in cement mortar of chromium removed from water using titania nanoparticles. *Journal of Environmental Management*. 172: 10-17.

I

Ishibashi Y, Cervantes C et Silver S. 1990. Chromium Reduction in *Pseudomonas putida*. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 56 (7): 2268-2270.

J

Jain M, Garg V K et Kadirvelu K. 2010. Adsorption of hexavalent chromium from aqueous medium onto carbonaceous adsorbents prepared from waste biomass. Journal of Environmental Management. 91 (4): 949–957.

K

Kramer U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. Current Opinion in Biotechnology. 16 (2): 133–141.

Krishna K R et Philip L. 2005. Bioremediation of Cr (VI) in contaminated soils. Journal of Hazardous Materials. 121: 109-117.

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

L

Li Y et Xue H. 2001. Determination of Cr (III) and Cr (VI) species in natural waters by catalytic cathodic stripping voltammetry. Analytica Chimica Acta. 448 (1): 121–134.

Losi M E, Amrhein C et Frankenberger J. 1994. Environmental biochemistry of chromium. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 136: 91-121.

Lydiate D J, Mendez C, Kieser H M et Hopwood D A. 1988. Mutation and cloning of clustered *Streptomyces* genes essential for sulphate metabolism. Molecular Genetics and Genomics. 211(3): 415-423.

M

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

Mahajan G et Sud D. 2013. Bioremediation of Cr (VI) metal ion from aqueous solutions using modified lignocellulosic agricultural waste biomass. International Journal of Advanced Technology and Engineering Research. 3 (2): 35-43.

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

Mench M, Vangronsveld J, Clijsters H, Lepp N et Edwards R. 1999. In situ metal immobilisation and phytostabilization of contaminated soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. 323- 358.

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

Monachese M, Burton J P et Reid G. 2012. Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (18): 6397-6404.

Mulligan C N, Yong R N et Gibbs B F. 2001. An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments. *Journal of Hazardous Materials*. 85 (1-2): 145-163.

Muthuraman M S, Priya K S, Roja1 K, Priya S A et Sivasubramanian A. 2013. Detoxification and bioremediation of chromium (VI) from the tannery effluents. *African Journal of Biotechnology*. 13 (2): 111-152.

N

Ncibi M, Mahjoub B et Seffen M. 2008. Étude de la biosorption du chrome (VI) par une biomasse méditerranéenne : *Posidonia oceanica* (L) delile. *Revue des Sciences de l'Eau*. 21(4): 441-449.

O

Opperman D J, Piater L A et Van Heerden E. 2008. A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. *Journal of Bacteriology*. 190 (8): 3076–3082.

Ozturk S, Kaya T, Aslim B et Tan S. 2012. Removal and reduction of chromium by *Pseudomonas* spp and their correlation to rhamnolipid production. *Journal of Hazardous Materials*. 231-232: 64– 69.

P

Pamukcu S et Wittle J K. 1992. Electrokinetic removal of selected heavy metals from soil. *Environmental Progress*. 11 (3): 241-250.

Peuke A D et Rennenberg H. 2005. Phytoremediation. *EMBO*. 6 (6): 497–501.

Pillai P et Archana G. 2012. A novel process for biodegradation and effective utilization of chrome shavings, a solid waste generated in tanneries, using chromium resistant *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochemistry*. 47 (12): 2116–2122.

Polti M A, Amoroso M J et Abate C M. 2007. Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. *Chemosphere*. 67 (4): 660–667.

Potgieter S S, Panichev N, Potgieter J H et Panicheva S. 2003. Determination of hexavalent chromium in South African cements and cement-related materials with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Cement and Concrete Research*. 33 (10): 1589-1593.

R

Ramasami T et Prasad B G S. 1991. Environmental aspects of leather processing. 25th Leather Exposition. Indian Leather Technologists' Association. 43-71.

Rodier J. 2009. L'analyse de l'eau. Dunod, Paris. 9^e édition. 262-263.

S

Shakoori A R, Makhdoom M et Haq R U. 2000. Hexavalent chromium reduction by a dichromate resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53 (3): 348–351

Shanker A K, Cervantes C, Loza-Tavera H et Avudainayagam S. 2005. Chromium toxicity in plants. *Environment International*. 31(5): 739– 753.

Shanker A K, Djanaguiraman M, Sudhagar R, Chandrashekar C N et Pathmanabhan G. 2004. Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiate* (L) R Wilczek cv CO 4) roots. *Plant Science*. 166 (4): 1035-1043.

Singh N, Verma T et Gaur R. 2013. Detoxification of hexavalent chromium by an indigenous facultative anaerobic *Bacillus cereus* strain isolated from tannery effluent. *African Journal of Biotechnology*. 12 (10): 1091-1103.

Sisti F, Allegretti P and Donati E. 1996. Reduction of dichromate by *Thiobacillus ferrooxidans* *Biotechnology letters*. 18 (12): 1477-1480.

Smith F W, Hawkesford M J, Prosser I M et Clarkson D T. 1995. Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Molecular Genetics and Genomics*. 247 (6): 709-715.

Soni S K, Singh R, Awasthi A, Singh M et Kalra A. 2013. In vitro Cr (VI) reduction by cell-free extracts of chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil. *Environmental Science Pollution Research*. 20 (3): 1661–1674.

Srinath T, Khare S et Ramteke P W. 2001. Isolation of hexavalent chromium-reducing Cr-tolerant facultative anaerobes from tannery effluent. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 47 (6): 307–312.

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

Sukumar C, Janaki V, Kamala-Kannan S et Shanthi K. 2013. Biosorption of chromium(VI) using *Bacillus subtilis* SS-1 isolated from soil samples of electroplating industry. *Clean Technology and Environmental Policy*. 16 (2): 405-413.

T

Thacker U, Parikh R, Shouche Y et Madamwar D. 2006. Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. *Process Biochemistry*. 41(6): 1332–1337.

Thacker U, Parikh R, Shouche Y, Madamwar D. 2007. Reduction of chromate by cell-free extract of *Brucella* sp isolated from Cr (VI) contaminated sites. *Bioresource Technology*. 98 (8): 1541-1547.

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

U

Uysal Y. 2013. Removal of chromium ions from wastewater by *duckweed Lemna minor L* by using a pilot system with continuous flow. *Journal of Hazardous Materials*. 263: 486– 492.

V

Viti C, Pace A et Giovannetti L. 2003. Characterization of Cr (VI) resistant bacteria isolated from chromium contaminated soil by tannery activity. *Current Microbiology*. 46 (1): 1–5.

W

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 (1): 50–56.

X

Xu W H, Jian H, Liu Y G, Zeng G M, Li X et Zhang W. 2015. Bioreduction of chromate by an isolated *Bacillus anthracis* Cr-4 with Soluble Cr (III) product. *Water, Air and Soil Pollution*. 226 (3): 1-9.

Xu W H, Liu Y G, Zeng G M, Li X, Song H X et Peng Q Q. 2009. Characterization of Cr (VI) resistance and reduction by *Pseudomonas aeruginosa* . *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 19 (5): 1336–1341.

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.

Z

Zahoor A et Rehman A. 2009. Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal of Environmental Sciences*. 21 (6): 814–820.

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 (2): 786-796.

Annexe 1 : Préparation du bouillon nutritif (1 L)

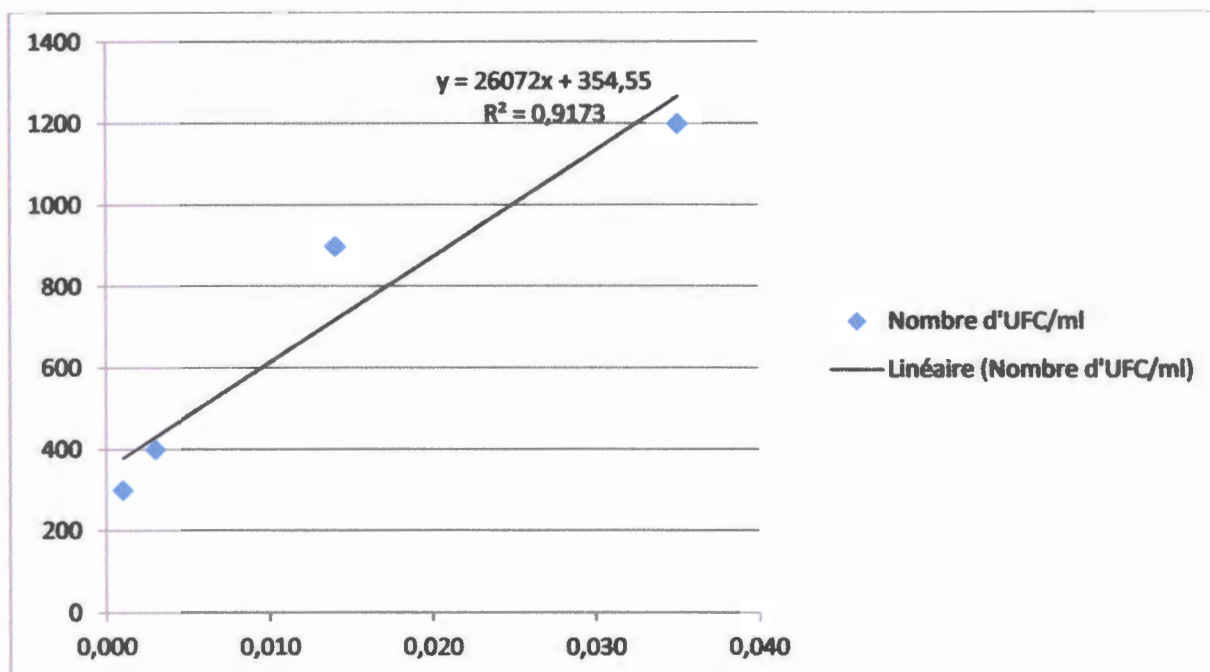
Dissoudre 8 g de BN déshydraté dans 1 L d'eau distillée et autoclaver.

Annexe 2 : Composition du Tampon phosphate 0,1 M (100 ml)

Dissoudre 0,675 g de KH_2PO_4 dans 50 ml d'eau distillée.

Dissoudre 0,871 g de K_2HPO_4 dans 50 ml d'eau distillée.

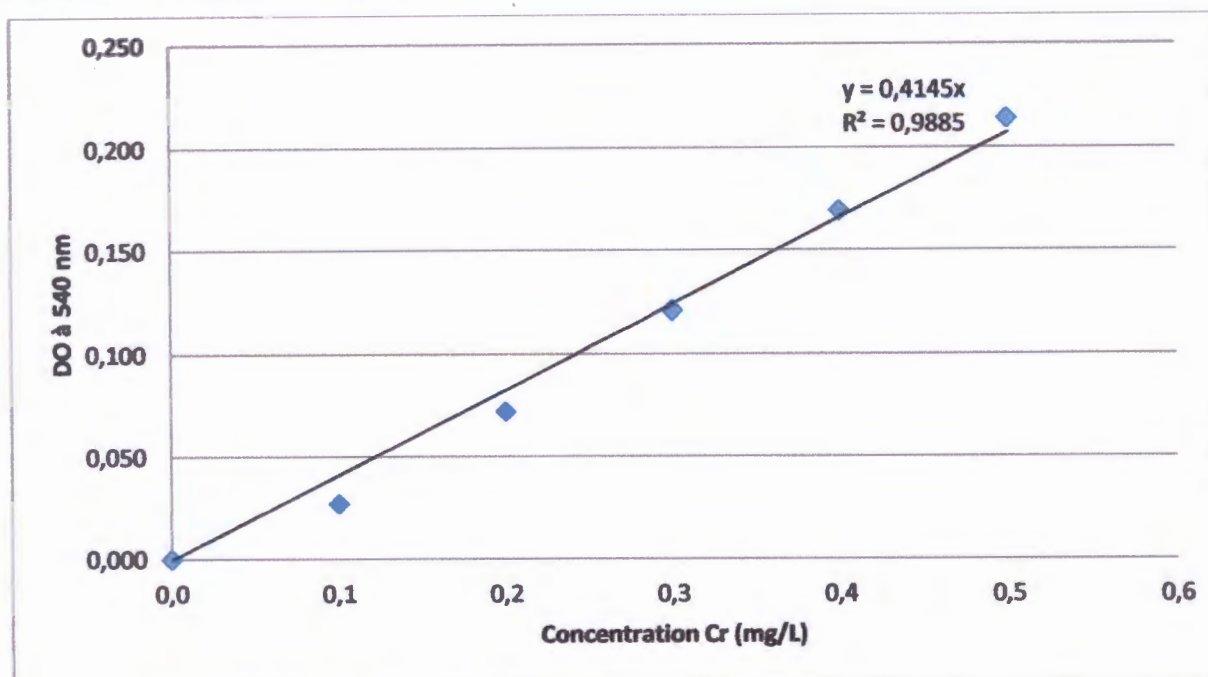
Mélanger les deux préparations et ajuster le pH à 7.

Annexe 3 : Courbe étalon de *Bacillus megaterium* (A3-1).

Les valeurs de DO à 600 nm et le nombre de colonies correspondant pour la réalisation de la courbe d'étalonnage de la souche *Bacillus megaterium* (A3-1).

Dilution	DO à 600 nm	Nombre d'UFC/ml
10^{-6}	0,035	1200
10^{-7}	0,014	900
10^{-8}	0,003	400
10^{-9}	0,001	300

Annexe 4 : Courbe étalon du chrome



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

Solution étalon n°	Concentration Cr (mg/L)	DO à 540 nm
1	0,0	0,000
2	0,1	0,027
3	0,2	0,072
4	0,3	0,121
5	0,4	0,169
6	0,5	0,214

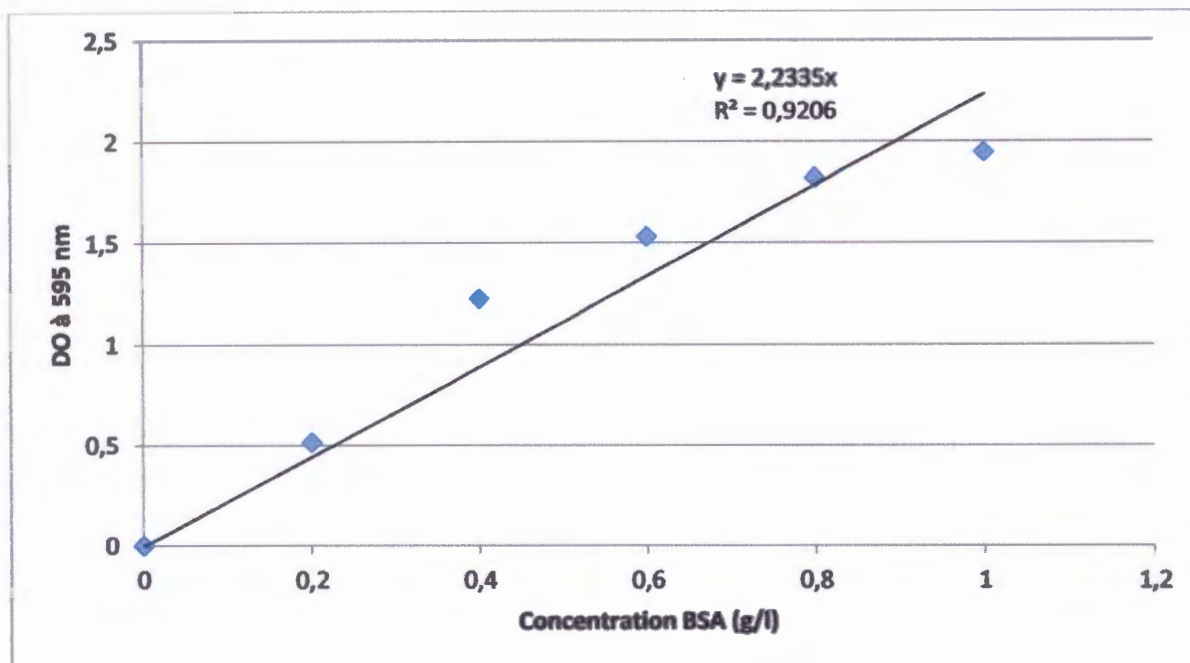
Les valeurs de DO des échantillons testés et les concentrations calculées.

	DO à 540 nm	Concentration calculée (mg/L)
t0	0,061	29,433
t24	0,056	27,021
t48	0,005	2,413
t72	0,000	0,000

N.B. Pour $V = 50$ ml, $F = 2$ (Institut Scientifique de Service Public (ISSeP). 2014. Le Compendium Wallon des méthodes d'Echantillonnage et d'Analyse (CWEA). E-II-3v3. 7.)

De plus, les échantillons ont été dilués au centième (1/100), donc $F = 200$.

Annexe 5: Courbe étalon de la BSA.



Les concentrations des solutions étalons de BSA préparées et valeurs de DO mesurée à 595 nm.

Solution étalon n°	Concentration BSA (g/L)	DO à 595 nm
1	0	0
2	0,2	0,515
3	0,4	1,225
4	0,6	1,531
5	0,8	1,820
6	1	1,946

Les valeurs de DO des échantillons testés et les concentrations calculées.

	DO à 595 nm	Concentration calculée (g/L)
t0	0,113	0,051
t24	0,143	0,064
t48	0,247	0,111
t72	0,444	0,199

Annexe 6 : Les valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour le test de l'effet du Cr sur la croissance bacterienne.

	BN sans Cr	BN + Cr 10 mg/L	BN + Cr 20 mg/L	BN + Cr 30 mg/L	BN + Cr 40 mg/L	BN + Cr 50 mg/L
t0	0,313	0,306	0,222	0,288	0,106	0,192
t1	0,648	0,523	0,459	0,370	0,124	0,187
t2	1,353	0,998	0,748	0,473	0,129	0,193
t3	1,704	1,347	1,102	0,543	0,180	0,179
t4	2,813	1,715	1,299	0,772	0,134	0,212
t24	3,838	3,175	2,482	1,658	0,397	0,276
t48	4,505	3,884	3,005	2,717	0,434	0,296
t72	4,667	4,020	3,067	2,798	0,611	0,258

Annexe 7 : Les valeurs de la DO mesurée à 600 nm pour le suivi de la croissance en présence de 30mg/L de Cr.

Cinétique de croissance de (A3-1) + 30 mg/L de Cr	
t0	0,145
t24	1,721
t48	3,970
t72	4,180

Annexe 8 : Les valeurs de la DO mesurée à 540 nm pour le teste de l'élimination du Cr.

	DO à 540 nm	Concentration calculée (mg/L)
t0	0,061	29,433
t24	0,056	27,021
t48	0,005	2,413
t72	0,000	0,000

Annexe 9 : Les valeurs de la DO mesurée à 540 nm pour le test la bioaccumulation.

	(A3-1)	(A3-1) + Cr
DO à 540 nm	0,001	0,057
Concentration calculée (mg/L)	0,483	27,503

Annexe 10 : Les valeurs de la DO mesurée à 540 nm pour le test de l'essai enzymatique.

	DO à 540 nm	Concentration calculée (mg/L)
t0	0,002	0,965
t24	0,001	0,483
t48	0	0,000
t72	0	0,000

Présenté par :
Adjeroud Meriem
Taleb Rim

Présidente : M^{me} Roula Sagia
Examineur : Mr. Laib Essaid
Encadreur : Dr. Ouled Haddar Houria

Elimination du chrome (VI) par *Bacillus megaterium*, un hyperaccumulateur isolé de la boue activée de la tannerie de Jijel

Résumé

Le Cr (III) est utilisé dans l'industrie de la tannerie et en absence de traitements des effluents, il est oxydé en sa forme la plus toxique le Cr (VI). Le chrome hexavalent Cr (VI) est reconnu comme carcinogène et mutagène. Plusieurs bactéries possèdent la capacité de réduire le Cr (VI), de l'accumuler ou de l'adsorber, ainsi la bioremédiation représenterait une alternative au traitement physico-chimique des sols et des eaux contaminés.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer la capacité de la souche *Bacillus megaterium* (A3-1) à résister au Cr (VI), en déterminant la CMI d'une part, et d'autre part d'étudier les différents mécanismes d'élimination du Cr (VI), notamment la réduction enzymatique et la bioaccumulation.

Les résultats obtenus ont montré que *Bacillus megaterium* (A3-1) présentait une CMI en Cr (VI) de 80 mg/L, et possédait un pouvoir réducteur de 100 % après 72h d'incubation à 37°C avec une concentration initiale en Cr (VI) de 30 mg/L, ainsi qu'une capacité de bioaccumulation du métal à raison de 27,50 mg/g du poids sec en biomasse.

Mots clés : *Bacillus megaterium*, chrome hexavalent, chrome IV reductase, bioaccumulation

Abstract

Cr(III) is used in tannery processing and when left untreated, it is converted to its toxic form Cr(VI), due to oxidation. The toxic hexavalent chromium Cr(VI) is known to be carcinogenic and mutagenic. Several bacteria possess the capability to reduce Cr(VI), to accumulate it or to adsorb it, so bioremediation gives immense opportunities for the development of technologies to detoxify Cr(VI)-contaminated soils or water as an alternative to the existing physicochemical technologies.

The aim of the work was to evaluate the ability of *Bacillus megaterium* (A3-1) to resist the Cr (VI), by determining the MIC, on the one hand, and secondly to study the various Cr (VI) removal mechanisms, including enzymatic reduction and bioaccumulation.

Our results indicated that, *Bacillus megaterium* (A3-1) exhibited an MIC for Cr (VI) of 80 mg/L, and could reduce chromate to 100 % at a concentration of 30 mg/L after 72 h at 37 °C, furthermore, the rates of Cr (VI) accumulation were 27,50 mg/g dry weight for 30 mg Cr (VI)/L.

Keywords: *Bacillus megaterium*, hexavalent chromium, hexavalent Cr reductase, bioaccumulation

ملخص

يستخدم الكروميوم (III) في دباغة الجلود، وفي غياب معالجة فعالة للنفايات السائلة التي ترمى في البيئة يتأكسد إلى حالته الأكثر سمية أي الكروميوم السداسي (VI). يعرف هذا الأخير بأنه مسرطن و مطفر. تمتلك الحديد من أنواع البكتيريا القوة على إرجاع الكروميوم (VI) أو تخزينه أو إدمصاصه. تعتبر المعالجة البيولوجية بديلا للمعالجة الفيزيائية و الكيميائية للتربة و المياه الملوثة. يهدف هذا العمل إلى تقييم قدرة السلالة *Bacillus megaterium* (A3-1) على مقاومة الكروميوم (VI) من خلال تحديد التركيز الأدنى المثبط من جهة، و من جهة أخرى دراسة مختلف آليات إزالة الكروميوم (VI)، بما في ذلك الإرجاع الإنزيمي و التراكم الخلوي.

أظهرت النتائج أن *Bacillus megaterium* (A3-1) تمتلك تركيز أدنى مثبط قدر ب 80 مغ/ل من الكروميوم (VI) و قوة إرجاع تقدر ب 100 % بعد 72 ساعة من الحضان عند 37 °م في وجود 30 مغ/ل كتركيز أولي من الكروميوم (VI)، كما أظهرت السلالة قدرة معتبرة على التراكم الخلوي للمعدن قدرت ب 27,50 مغ/غ من الوزن الجاف للكتلة الخلوية.

كلمات مفتاحية: *Bacillus megaterium*، الكروميوم السداسي، أنزيم إرجاع الكروميوم VI، التراكم الخلوي

