

**Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du
Littoral**

Département des Ressources Vivantes

Année universitaire 2023/2024

Spécialité : Biotechnologie marine

**Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur**

Thème :

***L'interaction des micro-organismes avec des
métaux et Etude de faisabilité des biocapteurs
pour la surveillance environnementale des eaux
côtières***

Présenté par :

soutenu le : 23/09/2024

Melle Ben mehenni Chana

Devant le Jury :

KHELIFA Nedjma	MCA	Présidente de jury
AMROUCHE Lynda	MAA	Examinatrice
Ghazi Malika	MCA	Promotrice

Remercîments

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à Dieu Tout-Puissant, qui m'a donné la force et la persévérance pour mener à bien ce travail.

Je remercie sincèrement **Dr. Ghazi Malika**, mon encadrante, pour avoir accepté de me guider et pour avoir dirigé ce travail avec tant de patience, de sagesse et de compétence. Votre soutien constant et vos précieux conseils ont été essentiels à l'aboutissement de ce projet.

Je souhaite également remercier tous les ingénieurs de laboratoire, pour leur aide chaleureuse, leurs conseils avisés, et leur disponibilité tout au long de ce travail.

Un grand merci à l'ensemble de mes enseignants, qui m'ont accompagné et ont contribué à ma formation tout au long de mon cursus universitaire.

Mes remerciements vont également à mes meilleures amies :

- **Manel**, pour son soutien moral, sa bonne humeur, et ses encouragements constants. Je te suis profondément reconnaissante pour ton aide précieuse, donnée avec tant de générosité.
- **Rayane**, pour ta gentillesse, ta patience, et ton soutien tout au long de ce travail. Merci de m'avoir aidée avec tant de bienveillance.
- **Amina, Ferial, Zahira**, pour être toujours présentes quand j'avais besoin de vous. Votre amitié est un trésor inestimable.

Je n'oublie pas mes camarades de promotion, avec qui j'ai partagé de nombreux moments inoubliables au cours de ces années. Votre amitié et votre solidarité ont rendu ce parcours plus agréable.

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Et surtout, à l'ENSSMAL pour m'avoir ouvert ses portes et m'avoir offert l'opportunité de poursuivre mes études au sein de cette institution prestigieuse. Grâce à l'accueil chaleureux, aux ressources académiques de qualité, et à l'environnement stimulant qu'elle offre.

Dédicace

À mes parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien et leurs sacrifices qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Papa, Maman, vous êtes mon roc et ma plus grande source d'inspiration.

À ma sœur Nesrine, pour être toujours à mes côtés, pour ton écoute et ta bienveillance qui me réchauffent le cœur.

À mes frères Sofiane et Badiss, pour les rires partagés, les encouragements constants et l'énergie positive que vous m'apportez chaque jour.

À ma famille et à tous mes amis, qui ont cru en moi et m'ont accompagné tout au long de ce voyage. Votre présence dans ma vie est un véritable trésor.

Merci à vous tous de faire partie de mon monde et de m'avoir aidé à réaliser ce rêve.

Résumé

Les milieux aquatiques sont intensément contaminés par des émissions continues d'origine anthropique, notamment de métaux lourds, qui détériorent la qualité de l'eau dans plusieurs régions du monde. Cette pollution peut avoir des conséquences sévères, affectant la chaîne alimentaire et présentant un risque pour la santé humaine. Mes recherches portent sur l'étude des réponses des micro-organismes en tant que bioindicateurs spécifiques des métaux lourds dans ces milieux fortement pollués. Les micro-organismes pourraient jouer un rôle clé dans la détection précoce de la pollution, contribuant ainsi au développement de stratégies de remédiation et de préservation de l'environnement. L'objectif est d'évaluer la réactivité des micro-organismes aux métaux émis principalement par les industries locales et d'explorer leur utilisation comme biocapteurs pour la surveillance des eaux de surface et côtières, tout en améliorant notre compréhension des impacts sur la santé humaine et l'écosystème aquatique.

تتعرض الأنظمة المائية لتلوث كبير ناتج عن الانبعاثات المستمرة ذات المنشأ البشري، خاصة المعادن الثقيلة، مما يؤدي إلى تدهور جودة المياه في عدة مناطق حول العالم. هذا التلوث قد يسبب تأثيرات خطيرة، تؤثر على السلسلة الغذائية وتشكل تهديداً على صحة الإنسان. تركز أبحاثي على دراسة استجابات الكائنات الدقيقة باعتبارها مؤشرات بيولوجية خاصة بالمعادن الثقيلة في هذه البيئات الملوثة بشدة. قد تلعب هذه الكائنات دوراً مهماً في الكشف المبكر عن التلوث، مما يساعد في تطوير استراتيجيات فعالة لمعالجة البيئة والحفاظ عليها. الهدف من البحث هو تقييم تفاعل الكائنات الدقيقة مع المعادن الصادرة بشكل رئيسي من الصناعات المحلية، واستكشاف إمكانياتها كمستشعرات بيولوجية لمراقبة المياه السطحية والساحلية، مع تحسين فهمنا لتأثيراتها على صحة الإنسان والنظام البيئي المائي.

Abstract

Aquatic environments are intensely contaminated by continuous emissions of anthropogenic origin, including heavy metals, which deteriorate water quality in several regions of the world. This pollution has severe consequences, affecting the food chain and posing a risk to human health. My research focuses on the study of the responses of microorganisms as specific bioindicators of heavy metals in these highly polluted environments. Microorganisms could play a key role in the early detection of pollution, thus contributing to the development of remediation strategies and environmental preservation. The objective is to assess the reactivity of microorganisms to metals emitted mainly by local industries and to explore their use as biosensors for monitoring surface and coastal waters, while improving our understanding of the impacts on human health and aquatic ecosystem.

Table des matières

Liste des figures :	1
Liste des tableaux	2
Introduction générale.....	1
CHAPITRE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I.1. Les métaux dans l'environnement	3
I.1.1 Origine naturelle et anthropique des métaux en milieu aquatique	3
I.1.2 Biodisponibilité et bioaccumulation des métaux dans les milieux pollués	4
I.1.2.1 Influence du pH	5
I.1.2.2 Influence du potentiel redox	6
I.1.2.3 Influence des argiles	6
I.1.2.4 Influence de la matière organique.....	7
I.2 Les risques toxiques des métaux pour l'homme et l'écosystème	7
I.3 La réactivité biologique des microorganismes aux métaux	8
I.3.1 Les mécanismes de la résistance bactérienne aux métaux.....	9
I.3.2 Les bioessais et les relations doses-réponse	10
I.4 Le principe des biocapteurs bactériens.....	12
I.5 Les applications environnementales des biocapteurs bactériens.....	14
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODE	16
II.1 Présentation de la zone d'étude	16
II.1.1 La baie d'Alger.....	16
II.1.2 Le bassin versant de l'oued El-Harrach.....	16
II.1.3 Les sources industrielles des rejets des métaux.....	18
II.2 Inventaire des émissions de métaux dans les rejets industriels et les milieux récepteurs.....	20
II.3 Préparation des échantillons environnementaux	21
II.3.1 Choix des stations de prélèvements	21
II.3.2 Les conditions de prélèvement.....	24
II.3.3 La préparation des échantillons analytiques	24
II.3.4 L'isolement et l'identification des bactéries	25
II.3.4.1 La technique d'isolement.....	25
II.3.4.2 L'identification bactériologique par caractérisation morphologiques, physiologiques et biochimique.....	26
II.4 Evaluation de l'interaction des bactéries avec des métaux	30
II.4.1 Préparation du milieu de culture avec des concentrations variables des métaux.....	30
II.4.2 Préparation de l'inoculum bactérien	30

II.4.3 Observation de la croissance bactérienne par spectrophotométrie.....	31
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS	33
III.1 Inventaire des émissions métalliques	33
III.1.1 Les concentrations de métaux dans les rejets industriels	33
III.1.2 Les concentrations de métaux dans les eaux.....	34
III.1.3 Les concentrations de métaux dans les sédiments	35
III.2 Isolement et identification de la flore bactérienne	35
III.2.1 Identification morphologique des souches bactériennes.....	35
III.2.2 Recherche de l'oxydase et de la catalase.....	36
III.2.3 Identification biochimique	37
III.3 Effet des métaux sur la croissance des bactéries.....	42
III.3.1 Effet du cadmium	42
III.3.2 Effet du cobalt	44
III.3.3 Effet du cuivre	45
III.3.4 Comparaison de la réactivité de chaque espèce bactérienne aux métaux.....	47
III.3.4.1 <i>klebsiella pneumoniae</i>	47
III. 3. 4. 2 <i>Raoultella ornithinolytica</i>	48
III. 3. 4.3 <i>Enterobacter cloacae</i>	48
III. 3. 4.4 <i>Citrobacter Freundii</i>	49
III.3.4.5 <i>Aeromonas Hydrophila</i>	49
III. 3. 4.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
III.4 Perspectives du développement de biocapteur bactérien pour la détection des métaux.....	51
CONCLUSION GENERALE	52
ANNEXES.....	60
ANNEXE 1 : Composition chimique des milieux de culture déshydratés	61
ANNEXE 2 : Réactifs pour lecture indirecte des résultats de la galerie.....	65
Annexe 1: Résultats de mesure de l'absorbance par densité optique (DO) à 600 nm Tableau 7 :.....	66
Annexe 2: Pourcentages de croissance mesurée par densité optique	67
Annexe 3: Emissions métalliques dans les rejets industriels	68
Annexe 4: Concentrations des métaux dans les eaux et les sédiments de l'Oued El Harrach et ses confluents.....	69

Liste des figures :

Figure 1 : Emissions anthropiques d'éléments traces métalliques dans les écosystèmes..	4
Figure 2 : Distribution de certaines espèces inorganiques du cuivre en fonction du pH....	6
Figure 3 : Principales structures bactériennes impliquées dans la résistance	10
Figure 4: schéma de la détermination de la CMI en milieu liquide	11
Figure 5 : Principe d'un biocapteur	14
Figure 6: Champ d'action des biocapteurs et moyens de reconnaissance associés	15
Figure 7: Situation géographique de la zone d'étude	17
Figure 8: Carte du bassin versant Oued El Harrach	18
Figure 9: Point de rejet industriel dans l'Oued Baba Ali	19
Figure 10: Les principales zones industrielles implantées dans la zone d'étude.....	19
Figure 11 : Localisation des stations des prélèvements d'échantillons	23
Figure 12: Les points de prélèvements	24
Figure 13 : Schéma de la préparation de solutions filles de dilution	25
Figure 14: Aspect de la galerie API 20 E après l'inoculation	29
Figure 15: Concentrations de métaux dans les rejets industriels.....	33
Figure 16: Concentrations de métaux dans les eaux de l'Oued El-Harrach et ses confluents	34
Figure 17: Concentrations de métaux dans les sédiments de l'Oued El-Harrach et ses confluents	35
Figure 18: Profil biochimique de l'espèce <i>Aeromonas Hydrophila</i>	39
Figure 19: Profil biochimique de l'espèce <i>Escherichia coli</i>	39
Figure 20: Profil biochimique de l'espèce <i>Raoultella ornithinolytica</i>	40
Figure 21: Profil biochimique de l'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Figure 22: Profil biochimique de l'espèce <i>klebsiella pneumoniae</i>	41
Figure 23 Profil biochimique de l'espèce <i>citrobacter freundii</i>	41
Figure 24: Profil biochimique de l'espèce <i>Enterobacter cloacae</i>	41
Figure 25: Profil biochimique de l'espèce <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	42
Figure 26: Effet du cadmium sur la croissance des différentes souches bactérienne	43
Figure 27 : Distribution du taux de croissance des souches vis-à-vis du cadmium	43
Figure 28 : Effet du cobalt sur la croissance des différentes souches bactériennes.....	44
Figure 29: Distribution du taux de croissance des souches vis-à-vis du cobalt.....	45
Figure 30: Effet du cuivre sur la croissance des différentes souches bactériennes	46
Figure 31: Distribution du taux de croissance des souches vis-à-vis du cuivre.....	46
Figure 32: Absorbance de <i>klebsiella pneumoniae</i>	47
Figure 33: Absorbance de <i>Raoultella ornithinolytica</i>	48
Figure 34: Absorbance de <i>Enterobacter cloacae</i>	48
Figure 35 : Absorbance de <i>Citrobacter Freundii</i>	49
Figure 36: Absorbance de <i>Aeromonas Hydrophilaen</i>	49
Figure 37: Absorbance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales unités industrielles du bassin d'oued El Harrach	20
Tableau 2 : Localisation de quelques sites industriels émetteurs de métaux dans la zone d'étude	21
Tableau 3: observations macroscopiques et microscopique des cultures bactériennes .	36
Tableau 4 : Résultats de la recherche d'oxydase et de catalase.	37
Tableau 5: Profil biochimique sur la galerie API 20 E des souches isolées	37
Tableau 6: Résultat de l'identification biochimique des souches isolées par l'API 20 E ..	38
Annexe 3: Résultats de mesure de l'absorbance par densité optique (DO) à 600 nm	
Tableau 7 :	66
Tableau 8 : Pourcentage de croissance mesuré.....	67
Tableau 9 : Emissions métalliques dans les rejets industriels.....	68
Tableau 10 : Concentrations des métaux dans les eaux	69
Tableau 11 : Concentrations des métaux dans les sédiments.....	69

Introduction générale

Les eaux superficielles et côtières font l'objet d'une contamination complexe caractérisée par une diversité spatiale et temporelle, directement influencée par les flux continus d'émissions d'origine industrielle, agricole et urbaine dans les zones continentales. Cette pollution, d'une nature particulièrement préoccupante, englobe également les métaux lourds, ajoutant ainsi une dimension critique à la détérioration de la qualité de l'eau et le risque sur la santé humaine (Belanger, David, 2009).

Les conséquences de cette contamination sont multiples. D'une part, les métaux lourds peuvent s'accumuler dans les organismes marins, affectant ainsi la chaîne alimentaire et présentant des risques potentiels pour la santé humaine lors de la consommation de fruits de mer contaminés (Haan et al. 1993, Ramade, 1992). D'autre part, ces substances toxiques ont des effets dévastateurs sur la biodiversité marine, perturbant les écosystèmes côtiers fragiles (Ramade, 1992).

Les réponses de ces écosystèmes aquatiques modifiés par l'activité humaine sont hautement variables, dépendant étroitement de la biodiversité microbienne présente et des réactions biologiques de ses diverses composantes (Hebert et Legaret, 2000).

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de recherche de fin d'étude, une nécessité émerge quant à l'identification et l'étude des interactions précises des micro-organismes et de leur réponse face au stress entropique en agissant en tant que bioindicateurs spécifiques des métaux lourds présents dans des environnements fortement pollués. En tant que témoins sensibles des altérations environnementales, les micro-organismes pourraient jouer un rôle clé dans la détection précoce et la quantification de la pollution (Rietiier, 2001). Cette approche pourrait ainsi contribuer à élaborer des stratégies de préservation et de remédiation environnementale, tout en ouvrant la voie à une meilleure compréhension des impacts de la contamination par les métaux lourds sur la santé humaine et l'écologie marine. L'objectif est d'étudier la faisabilité de l'utilisation de ces micro-organismes en tant que biocapteurs potentiels dans le cadre de la surveillance environnementale des eaux côtières.

Ce travail est développé selon les chapitres suivants :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique sur le comportement géochimique des métaux dans l'environnement, en prenant en compte : leur origine naturelle et anthropique ; les facteurs géochimiques qui influencent leur biodisponibilité et leur bioaccumulation dans les milieux pollués ; leurs risques toxiques pour l'homme et l'écosystème ; les mécanismes de la résistance bactérienne aux métaux et enfin le principe des biocapteurs bactériens et leur applications environnementales . Le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés pour étudier l'interaction des micro-organismes avec les métaux et explorer l'application de ces réactions bactériennes pour la surveillance environnementale et la réduction de la pollution métallique dans les milieux aquatiques. Dans ce chapitre, il est question de

stratégie d'échantillonnage dans la zone d'étude ; d'inventaire des concentrations des métaux dans les différentes matrices polluées (effluents industriels, eaux et sédiments des oueds) ; des méthodes d'isolement et d'identification des souches locales des bactéries ainsi que l'évaluation de leur réactivité aux métaux par mesure de leur croissance à l'aide de l'absorbance optique.

Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats et leur discussion, notamment ceux de l'isolement et l'identification des bactéries ainsi que les différentes valeurs d'absorbance optique spécifiques aux différentes souches bactériennes testées et selon le type et la concentration variable de l'élément métallique.

Dans la conclusion seront présentés les points clés de l'étude en soulignant l'intérêt et la limite des résultats obtenus pur répondre aux objectifs ainsi que les perspectives de développement de cette recherche pour proposer une solution de surveillance environnementale et de traitement des eaux polluées.

CHAPITRE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les métaux dans l'environnement

Les métaux lourds sont les éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse 5g/cm³ et qui possèdent un numéro atomique élevé. Ils sont omniprésents dans tous les compartiments de l'environnement (Air, Eaux, Sols, Sédiments), mais en général en quantités très faibles et ne sont pas biodégradables. Les géochimistes parlent d'éléments traces métalliques ou ETM à cause de leur présence en faible quantité et qui ne représente que 0,6 % (en masse) du total des constituants de la croûte terrestre (Blum, 1990). Dans le milieu aquatique un métal est défini comme un élément chimique qui peut former des liaisons ioniques et perdre des électrons pour former des cations. (Belanger, David, 2007).

Les métaux les plus étudiés pris en compte dans la réglementation au niveau mondial sont le Mercure, le Plomb, le Cadmium, le Cuivre, l'Arsenic, le Nickel, le Zinc, le Cobalt et le Manganèse (Convention de Stockholm.2009). Les plus toxiques d'entre eux sont le Plomb, le Cadmium et le Mercure. Il est important d'explorer les mécanismes de résistance développés par certains microorganismes face à ces substances toxiques.

I.1.1 Origine naturelle et anthropique des métaux en milieu aquatique

L'origine des métaux présents en milieu marin est à la fois naturelle et anthropique. Naturellement présents dans la biosphère, ils proviennent, d'une part, de l'érosion mécanique et chimique des roches ainsi que le lessivage des sols et les activités géologiques sous-marines. D'autre part, la contribution d'origine anthropique est liée à plusieurs sources d'émissions métalliques dont les rejets industriels et domestiques, l'activité minière et les eaux d'écoulement contaminées par les engrais et les pesticides utilisés en agriculture. Ces différentes sources contribuent donc à l'augmentation des concentrations de métaux dans tous les milieux naturels terrestres et aquatiques, notamment en zone côtière méditerranéenne, où existe une forte pression urbaine et industrielle (Lacoue-Labarthe. 2009 ; Belanger, David. 2009).

Le relargage des métaux toxiques dans les milieux aquatiques entraîne une accumulation de ces éléments dans les sédiments. A ce niveau, ils peuvent être précipités et immobilisés, mais il y a aussi possibilité de remobilisation et de diffusion vers les nappes phréatiques (Förstner et Salomon, 1991). Si l'eau des rivières enrichie en métaux lourds est utilisée pour irriguer les sols d'agriculture, le retour des éléments traces dans l'alimentation est également possible.

Dans figure 1, sont montrées les contributions estimées de plusieurs sources anthropiques dans les émissions de métaux. Ainsi par exemple, la contribution majoritaire en As, Cr, Cu, Mn et Ni, est celle des effluents urbains, alors que pour le Cd et le Pb, c'est celle des retombées atmosphériques qui est la plus importante (Nriagu et Pacyna,1988).

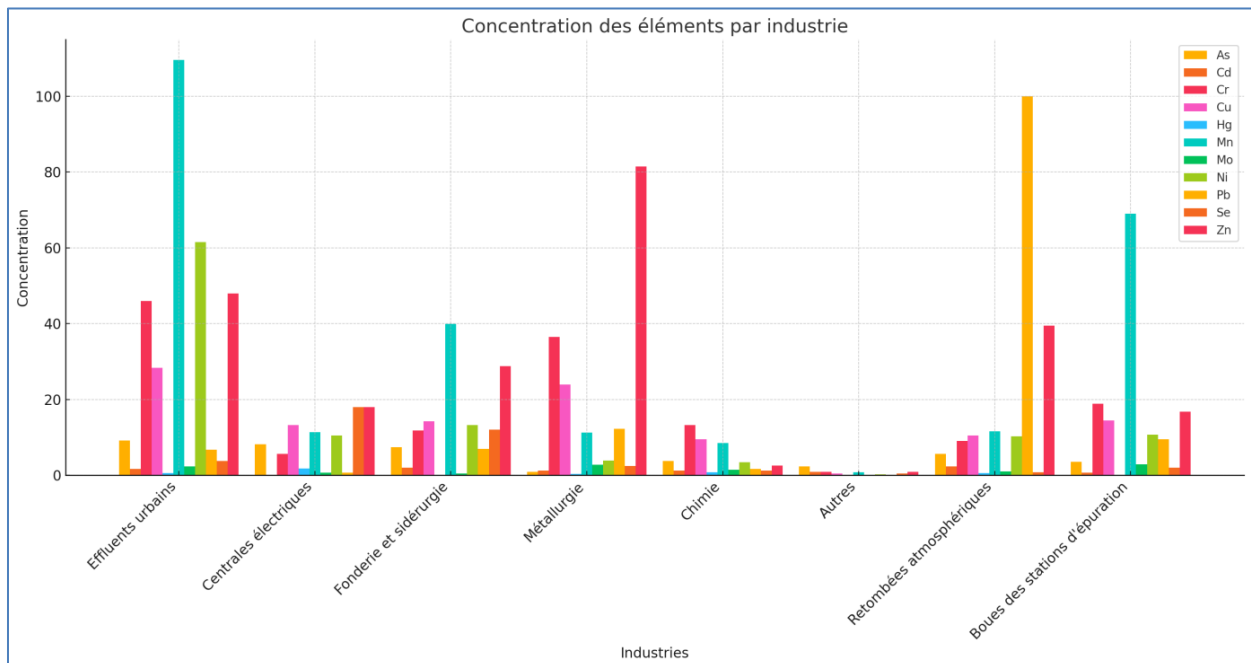


Figure 1 : Emissions anthropiques d'éléments traces métalliques dans les écosystèmes aquatiques (kg/an, d'après Nriagu et Pacyna 1988)

1.1.2 Biodisponibilité et bioaccumulation des métaux dans les milieux pollués

Le terme "biodisponibilité" est défini par la facilité avec laquelle une substance nutritive ou contaminante peut être absorbée par un système biologique et quantifié par l'effet de la substance pour l'organisme (Haan et al. 1993). Pour les métaux, on les considère comme étant bio disponible s'ils se trouvent sous forme d'ions libres, et donc généralement solubles et mobiles (Roane et Pepper, 2000).

Dans les phénomènes de pollution des eaux et des sédiments par les métaux lourds, les interactions sédiments-cations métalliques jouent un rôle clé qui règle le comportement de ces métaux, leur distribution dans la phase, solide et leur transfert dans l'eau. Ces interactions font intervenir plusieurs types de phénomènes de surface ; précipitation (sous formes oxydées, réduites), coprécipitation et adsorption (par plusieurs mécanismes) sur des composés minéraux et organiques (Serpaud, Al-Shukry al, 1994).

L'impact des métaux sur les organismes marins dépend fortement de leur forme chimique. Certains métaux peuvent exister sous des formes inertes, minimisant ainsi leur toxicité, tandis que d'autres peuvent adopter des formes plus réactives et

potentiellement nocives pour les organismes marins. Lorsque ces métaux deviennent biodisponibles, ils peuvent présenter des risques pour les organismes marins en raison de leur toxicité. Il semble que les formes conjuguées et liées des métaux lourds filtrées ne sont pas toxiques par eux-mêmes mais c'est la forme divalente de ces métaux libérés à partir de ces complexes qui est responsable de la toxicité cellulaire (Barbier et al, 2005). Il est donc important d'explorer les mécanismes de résistance développés par certains microorganismes face à ces substances toxiques.

La bioaccumulation des métaux traces dans les organismes aquatiques désigne la capacité des organismes aquatiques à concentrer et à accumuler les substances chimiques à partir du milieu (bioconcentration) et de la nourriture (biomagnification), à des concentrations bien supérieures à celles où elles sont présentes dans le milieu (Ramade, 1992). Ainsi, un métal lourd hautement biodisponible dans l'environnement, devient facilement accessible et absorbé par les organismes vivants. Une fois absorbé, ce métal lourd peut s'accumuler dans les tissus des organismes au fil du temps, entraînant ainsi la bioaccumulation.

Dans l'environnement marin, il existe des facteurs clés qui influent la biodisponibilité des métaux tels que le pH de l'eau, le potentiel redox, la présence d'autres éléments chimiques, ainsi que l'influence des argiles. Ces paramètres jouent un rôle crucial dans la détermination de la disponibilité des métaux pour les organismes marins.

I.1.2.1 Influence du pH

De manière générale, un milieu acide rend les métaux plus disponibles pour les organismes qu'un milieu alcalin. Les métaux lourds sont généralement plus solubles et plus mobiles à pH acide qu'à des pH élevés. En milieu acide, ils se trouvent sous forme d'ions libres, alors qu'une augmentation progressive du pH (donc des concentrations en ions hydroxydes) provoque la formation de complexes métalliques hydroxylés (Riether, 2001). Les métaux dissous peuvent précipiter en cas de changements de pH ou de conditions redox. Ceci peut être le cas au niveau des zones de confluences de cours d'eau par exemple.

L'influence du pH sur les concentrations dissoutes des formes cationiques des métaux lourds dans les rivières a été démontrée par plusieurs auteurs. Pour le zinc, par exemple, le pH agit en effet très fortement sur sa spéciation dans l'eau, c'est à dire sur les proportions de ses différentes formes chimiques (LE GOFF.BONNOMET,2004))La figure 3, montre les différentes espèces inorganiques du cuivre en fonction du Ph.

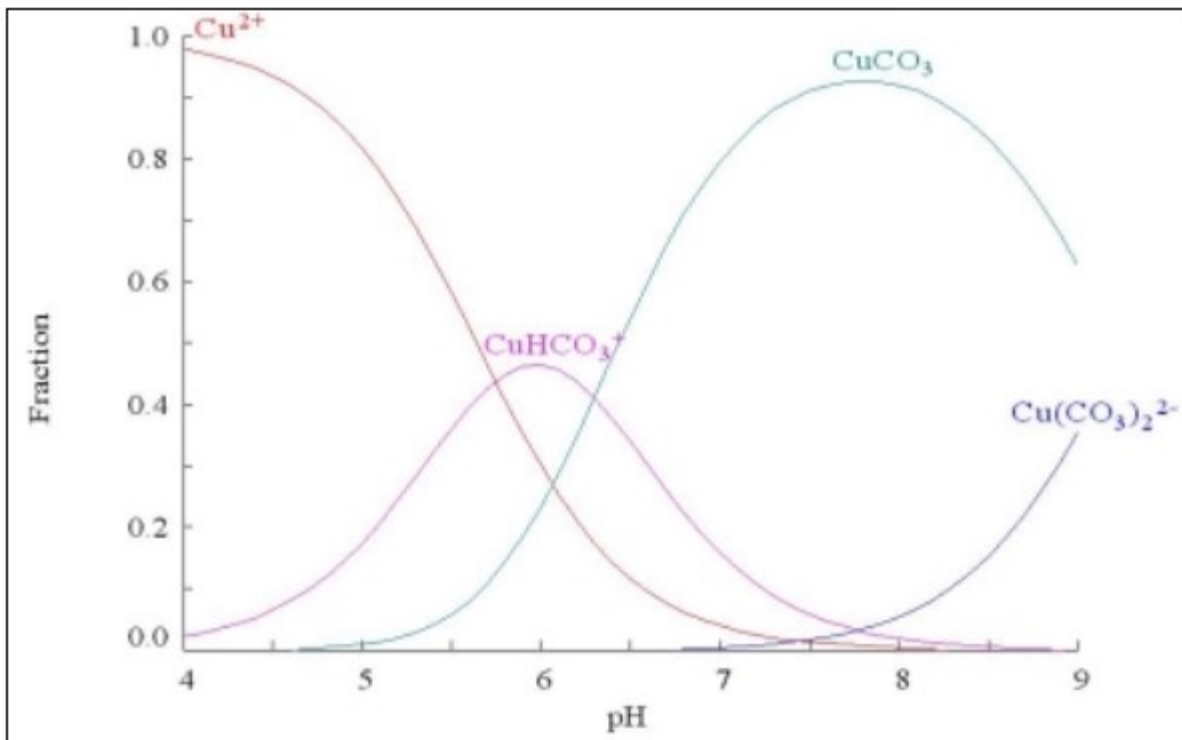


Figure 2 : Distribution de certaines espèces inorganiques du cuivre en fonction du pH (Le Goff.Bonnomet, 2004)

I.1.2.2 Influence du potentiel redox

Le potentiel redox est une mesure de l'oxydation et de la réduction des réactions chimiques qui peuvent influencer la solubilité, la mobilité et donc la disponibilité des métaux lourds dans l'environnement. Les conditions d'oxydo-réduction, mesurées par le potentiel d'oxydo-réduction (E_h), indiquent si un environnement peut fournir ou retirer des électrons à certaines substances chimiques. Cela affecte la façon dont les métaux se lient à d'autres substances. Par exemple, si l'environnement fournit des électrons, cela peut favoriser la liaison des métaux avec d'autres substances. À l'inverse, si l'environnement retire des électrons, cela peut rendre plus difficile la liaison des métaux avec d'autres substances (Deneux-Mustin et al. 2003). Les effets du potentiel d'oxydo-réduction et du pH sont interdépendants car ils modifient conjointement la disponibilité des électrons et des ions H^+ dans un environnement particulier, ce qui à son tour influence la forme ionique des métaux présents dans cet environnement (Riether, 2001).

I.1.2.3 Influence des argiles

Les argiles sont des minéraux constitués principalement de silicates d'aluminium, avec une structure en feuilles ou en fibres. Elles sont classées en trois grandes familles en fonction du nombre de couches tétraédriques et octaédriques présentes dans leurs feuilles. Les espaces entre ces feuilles peuvent contenir de l'eau ou des ions, ce qui leur

donne de vastes surfaces spécifiques et des capacités d'échange cationique élevées, favorisant ainsi la rétention des métaux lourds par adsorption. (Deschamps, Benzaazoua et al, 2006). Dans les sédiments, les métaux s'adsorbent en particulier très facilement sur les argiles. La dissolution des carbonates affecte le pH du sol, car les carbonates peuvent incorporer des cations métalliques. La silice, qu'elle soit cristalline ou amorphe, forme des groupements hydroxyles en surface qui permettent l'adsorption des cations métalliques. Les oxydes et les hydroxydes métalliques (fer, aluminium, manganèse) présents dans les sols jouent également un rôle crucial dans la rétention des ions métalliques, avec une forte dépendance vis-à-vis du pH du milieu (Bourg, 1988).

I.1.2.4 Influence de la matière organique

La matière organique présente dans le sol peut être divisée en deux fractions : une fraction vivante, comprenant la faune, la microflore et les racines, et une fraction morte, composée de débris organiques plus ou moins décomposés. Cette matière organique possède une grande surface spécifique et joue un rôle important dans le contrôle de l'acidité du sol. Les substances humiques, présentes dans la matière organique, peuvent fixer les ions métalliques par complexation. De plus, la matière organique des sols et des sédiments peut efficacement absorber chimiquement les ions métalliques avec une grande sélectivité, formant ainsi des liaisons ioniques ou covalentes fortes. La force et la réversibilité de ces liaisons dépendent du ligand organique impliqué. Ainsi, divers ligands organiques, tels que les groupes carboxyliques, phénoliques et carbonyles, sont capables de se lier aux métaux lourds dans les sols et les sédiments (McBride, 2000).

La présence de matière organique vivante, en particulier les microorganismes, est un facteur significatif qui influence la biodisponibilité des métaux. Les microorganismes possèdent des groupements à leur surface qui sont responsables de l'adsorption des métaux. Ce phénomène, appelé biosorption microbienne, peut contribuer à l'immobilisation des métaux dans les sédiments (Ramamoorthy et al, 1977). Il est largement utilisé comme méthode de dépollution des effluents contaminés par des métaux lourds (Lovley.Coates, 1997).

I.2 Les risques toxiques des métaux pour l'homme et l'écosystème

Les métaux lourds les plus souvent impliqués dans l'empoisonnement de l'homme sont le plomb, le mercure, l'arsenic et le cadmium. Certains métaux lourds, tels que le zinc, le cuivre, le chrome, le fer et le manganèse, sont requis par le corps en petites quantités, mais ces mêmes éléments peuvent être toxiques en grande quantité (Fallon, 2006). L'exposition aux métaux lourds est potentiellement dangereuse, en particulier les composés métalliques qui n'ont aucun rôle physiologique dans le métabolisme

cellulaire. L'ingestion des métaux via l'eau ou les aliments peut modifier le métabolisme d'autres éléments essentiels tels que Zn, Cu, Fe et Se (Abdulla et Chmielnicka, 1990).

La bioaccumulation des métaux traces dans les organismes aquatiques désigne la capacité des organismes aquatiques à concentrer et à accumuler les substances chimiques à partir du milieu (bioconcentration) et de la nourriture (biomagnification), à des concentrations bien supérieures à celles où elles sont présentes dans le milieu (Ramade, 1992).

En effet, les métaux lourds présents dans l'eau et les sédiments sont absorbés par les plantes et les animaux. Le dépassement d'une quantité donnée dans ces espèces provoque leur accumulation dans les organismes tout au long de la chaîne alimentaire. Ils peuvent atteindre des concentrations menaçant la survie de certaines populations naturelles et présenter des dangers pour le consommateur. Les produits marins présentent plus de risque du fait du haut potentiel de concentration des métaux dans les espèces marines, ainsi que de leur élimination difficile et de leur large répartition dans le milieu aquatique (Hebert et Legaret, 2000). A titre d'exemple, une intoxication mortelle s'était produite à Minamata au Japon dans les années 50. Les habitants avaient mangé du poisson contaminé par des rejets Mercuriels d'une usine située à proximité. Cette maladie s'est ensuite propagée à toute la jeune génération par le lait maternel (MEJ, 2013).

I.3 La réactivité biologique des microorganismes aux métaux

Les microorganismes peuvent interagir avec les métaux lourds présents dans leur environnement de différentes manières. Leur capacité à tolérer, accumuler ou dégrader ces métaux peut avoir des implications significatives sur la santé des écosystèmes et sur la santé humaine. Dans les milieux naturels (sols, eaux, sédiments) les microorganismes ont évolué à travers les temps pour développer des mécanismes de résistance afin de faire face aux stress causés par les métaux toxiques. Ces mécanismes, qui peuvent être génétiquement codés sur des gènes chromosomiques, des plasmides ou des transposons, permettent aux microorganismes de résister à une grande variété d'éléments du tableau périodique. (Silver et Misra, 1988 ; Silver 1998).

Les métaux lourds ont tendance à inhiber l'activité des microorganismes en bloquant les groupes fonctionnels, en déplaçant les ions métalliques essentiels ou en altérant les sites actifs des molécules biologiques. Cependant, à faible concentration, certains métaux comme le cobalt, le cuivre, le zinc et le nickel sont essentiels pour les microorganismes car ils agissent en tant que cofacteurs nécessaires pour les métalloprotéines et les enzymes. (Hassen et al., 1998).

Chez certaines espèces de microorganismes, la fixation d'ions métalliques se produit par biosorption qui est un processus physico-chimique naturel et passif ne requérant pas

d'énergie). Ceci est possible grâce à leur charge anionique de surface qui est liée à la présence de divers groupements fonctionnels. Dans le cas des champignons par exemple, les groupements fonctionnels acides présents dans la paroi tels que $-COOH$, $-SH$, $-OH$ et H_2PO_4 se révèlent être des biosorbants efficaces (Deneux-Mustn et al., 1994).

I.3.1 Les mécanismes de la résistance bactérienne aux métaux

Les principaux mécanismes de résistance aux métaux qu'on peut trouver chez les microorganismes sont :

- **La restriction à la pénétration** des métaux toxiques à travers une barrière de perméabilité, où l'entrée du métal dans la cellule est bloquée en altérant les systèmes de transport membranaires ou en fixant le métal à la surface cellulaire via des composants de la membrane externe, de la paroi ou des exopolysaccharides (Bruins et al., 2000).
- **La rétention intracellulaire ou extracellulaire** des métaux par des composants cellulaires qui les fixent. Il s'agit de petites protéines riches en cystéines dans le cytoplasme qui fixent des métaux lourds au niveau des groupements sulfhydryles. Ainsi, les métaux sont piégés à l'intérieur de la cellule et rendus inoffensifs (Silver et Phung, 1996).
- **Le transport actif par des systèmes d'expulsion** qui est un mécanisme prédominant de résistance des microorganismes aux métaux lourds. Ce mécanisme met en jeu des protéines membranaires très spécifiques qui expulsent les métaux toxiques du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Chez les bactéries, deux principaux systèmes de transport actif peuvent être distingués selon la source d'énergie : les transporteurs chimiosmotiques et les ATPases de type P. Les ATPases fournissant de l'énergie en hydrolysant l'ATP ce qui implique le transport actif des ions métalliques à travers les membranes cellulaires hors de la cellule contribuant ainsi à la résistance de la bactérie en réduisant leur concentration intracellulaire.
- **La modification enzymatique du métal** vers une forme moins toxique qui consiste en une transformation chimique par détoxifications enzymatique. Ceci se réalise par modification de l'état oxydoréduction d'un ion métallique en une espèce moins nocive pour la cellule (Royet, 2018). Les mécanismes enzymatiques de détoxification et les transporteurs de cations métalliques se distinguent par leur spécificité vis-à-vis des ions métalliques qu'ils traitent. Ces protéines possèdent des sites de liaison hautement sélectifs pour les métaux transportés. Ainsi, l'organisme est capable de différencier les métaux toxiques à éliminer des

éléments traces essentiels, dont la concentration intracellulaire doit être maintenue à des niveaux appropriés (Gadd, 1992).

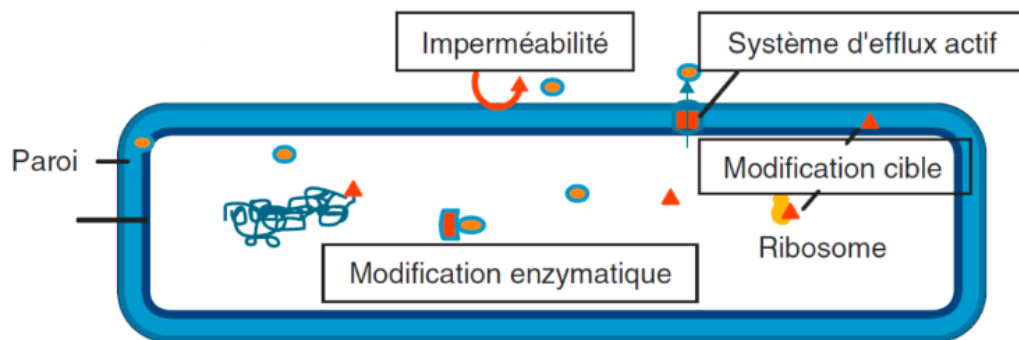


Figure 3 : Principales structures bactériennes impliquées dans la résistance

(AEMiP, Association des Enseignants-chercheurs de Microbiologie des Facultés de Pharmacie)

I.3.2 Les bioessais et les relations doses-réponse

L'interaction complexe entre des micro-organismes et des substances telles que les métaux est étudiée grâce aux bioessais. Ce sont des expériences menées au laboratoire pour mesurer l'effet d'une substance sur des organismes vivants exposés aux différentes concentrations afin de déterminer la puissance de l'effet. Ces bioessais permettent d'évaluer la toxicité d'un composé ou son effet sur l'activité biologique des organismes exposés. Ces tests sont importants dans la compréhension des mécanismes par lesquels les bactéries réagissent face aux métaux et comment ces derniers affectent leur croissance, leur survie et leur métabolisme.

Les résultats de ces bioessais sont appelés relations dose-réponse qui sont incontournables dans des domaines tels que la pharmacologie, la toxicologie et les sciences de l'environnement.

Ainsi, les bioessais consistent à exposer les bactéries à diverses concentrations de métaux afin d'analyser leurs réactions. Les paramètres évalués peuvent comprendre la croissance cellulaire, la viabilité des cellules, la production de biomasse, la synthèse de protéines spécifiques ou d'enzymes de détoxification (Gilbin, 2013).

Il existe plusieurs tests de toxicité bactérienne, dont

- **L'antibiogramme** Les antibiogrammes permettent de déterminer la sensibilité d'un microorganisme en mettant en présence une concentration standard du germe et des concentrations spécifiques d'antibiotiques, l'incorporation de l'antibiotique en gélose ou en milieu liquide, qui sont ensuiteensemencés avec le micro-organisme cible. Parmi ces méthodes, la technique en bouillon est considérée comme l'examen de référence (Eucast, 2021).

- **Le test d'inhibition de la croissance microbienne** où les bactéries sont exposées à diverses concentrations d'une substance et leur croissance est surveillée au fil du temps (Fig.4). Une diminution ou un arrêt de la croissance indique une toxicité (Leveau, Larpent et al. 2001)
- **Le test de diffusion sur disque (test Kirby-Bauer)** qui est également connu sous le nom de test de diffusion sur gélose utilisé pour déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et à différents composés antimicrobiens (Eucast, 2021).
- **Le test de concentration minimale inhibitrice (CMI)** qui permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice. C'est la plus petite concentration d'un produit chimique, généralement un antibiotique, un antifongique et /ou des composés actifs pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Hidri. Ploy., 2011).
- **Le test Microtox** qui repose sur la mesure de luminescence de bactéries marines bioluminescentes. L'effet inhibiteur de cette propriété naturelle sur les bactéries exposées au laboratoire est évalué à différentes concentrations de la substance ou du composé testés (Maurice, 1996).

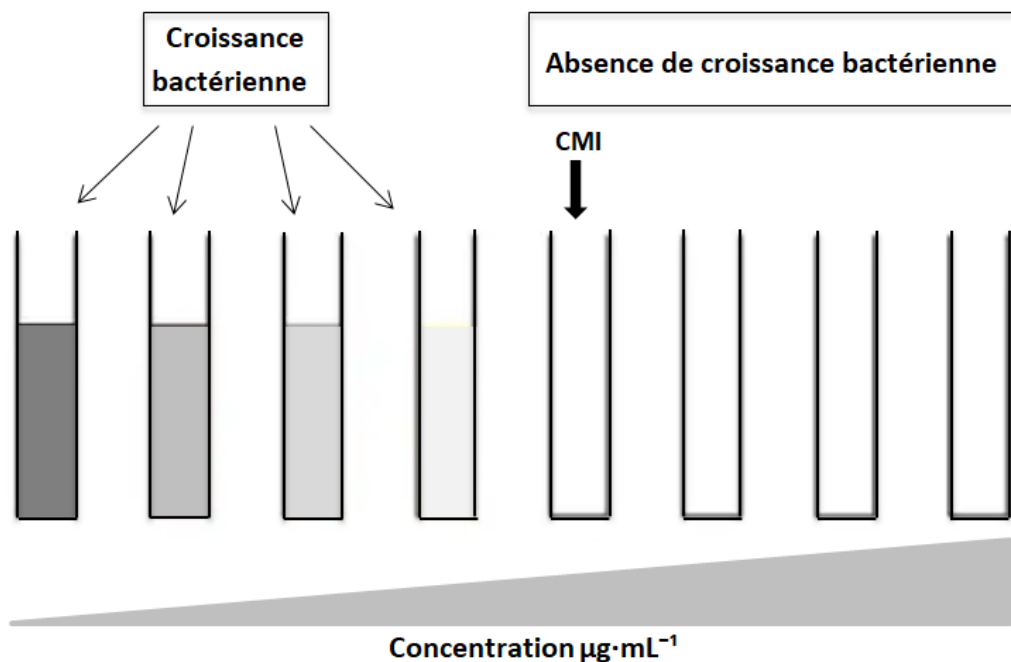


Figure 4: schéma de la détermination de la CMI en milieu liquide

I.4 Le principe des biocapteurs bactériens

L'analyse des éléments traces métalliques dans l'eau est souvent réalisée à l'aide de techniques analytiques telles que la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) ou la spectrométrie d'absorption atomique (AAS) pour la quantification des concentrations de métaux, ainsi que la spectrométrie à émission optique sur plasma à couplage inductif (ICP-OES). Cependant, ces équipements demeurent sophistiqués et sont associés à des coûts élevés. Des recherches sont en cours afin d'explorer la capacité de certains organismes à repérer les métaux disponibles dans leur environnement dans le but de développer des biocapteurs bactériens (Derouiche, Bessueille et al, 2021). L'un des principaux avantages d'utiliser les bactéries réside dans leur capacité à être rapidement produites en grandes quantités et à moindre coût. De plus, les bactéries ont la capacité de réagir rapidement à tout changement dans leur environnement, ce qui les rend efficaces pour signaler des perturbations dans leur habitat (Briscoe et al, 1996). Lorsque les microorganismes sont exposés aux substances polluantes, les gènes correspondants sont activés et commencent à être exprimés, conduisant à la production des pompes d'efflux. Par conséquent, si les niveaux de pollution métallique dans l'environnement augmentent, cela entraînera une augmentation de l'expression de ces gènes et, par extension, une augmentation de la production de pompes d'efflux. Ainsi, l'un des principes du fonctionnement du biocapteur existant est basé sur la mesure de l'expression génétique (Rietti, 2001).

Un capteur est donc défini comme un dispositif électronique capable de transformer une grandeur physique, chimique ou biologique mesurable en une grandeur électrique, qui est généralement une tension, une intensité ou un courant (Asch, 1993). En ce qui concerne le biocapteur, celui-ci est composé d'une partie moléculaire qui agit comme récepteur biologique et d'une partie physique appelée transducteur. Son principe de fonctionnement est basé sur l'interaction de l'élément biologique avec le substrat à analyser. Ses deux composantes principales sont :

- **Le matériau biologique** qui est l'élément sensible d'un biocapteur conçu pour reconnaître sélectivement l'espèce spécifique à analyser, appelée analyte. Diverses entités biologiques peuvent être utilisées à cette fin, notamment les enzymes, les anticorps, les antigènes, les cellules, les tissus et l'ADN. La composante biologique réagit avec l'échantillon à analyser. Elle capte donc l'analyte, pour traduire cette réaction en un signal qui est quantifiable par le transducteur. Cependant, leur utilisation dans des environnements du monde réel était limitée et ils ont réussi à détecter les substances cibles dans seulement des conditions expérimentales spécifiques et contrôlées en laboratoire (Simpson et al., 1998). Les réponses des

microorganismes impliquent souvent l'activation ou la désactivation de certains gènes. Ceci modifie la physiologie cellulaire pour s'adapter aux changements environnementaux et métaboliser une substance particulière, ou bien détoxifier des composés toxiques grâce aux gènes impliqués dans la biodégradation (DuBow, 1997). Afin d'analyser spécifiquement la présence d'une substance, d'autres types de biocapteurs utilisant des bactéries recombinées ont été développés (Rietier, 2001). D'autres études ont développé des éléments sensoriels basés sur des métaux régulateurs avec différents spectres de réponse aux métaux ont été génétiquement modifiés. Cette étude inspire le développement futur de biocapteurs capables de détecter un large spectre de métaux toxiques de manière dose-réponse dans différentes gammes de concentrations, émettant des signaux exclusifs pour des métaux spécifiques, et produisant des signaux quantitatifs visibles et colorimétriques (Yu Hu, Ye Hui et al, 2024).

- **Le transducteur** qui agit comme un convertisseur en transformant les interactions ou les reconnaissances physico-chimiques entre le récepteur biologique et la substance cible en un signal électrique, optique, ou chimique. La technologie des transducteurs englobe une variété d'approches, y compris des méthodes électrochimiques telles que l'ampèremètre, la potentiométrie et la conductimétrie, ainsi que des techniques optiques comme la mesure de l'absorption, de la fluorescence et de l'émission de lumière. Des dispositifs sont également disponibles pour détecter les changements calorimétriques et acoustiques (Sethi, 1994).

En ce qui concerne le système et le principe du transducteur, de nombreux types ont été utilisés pour développer des biocapteurs. La nature du transducteur sert souvent de base pour la classification des différents biocapteurs, notamment les transducteurs optiques, thermiques, mécaniques et électrochimiques (El Alami, 2018).

- **Le transducteur optique** est basé sur certains phénomènes tels que la fluorescence, l'ellipsométrie, la résonance plasmonique de surface (Lu, Spasic et al, 2017). Ce type de transducteur permet d'effectuer des mesures in situ et en temps réel avec une bonne sensibilité, une robustesse et des faibles temps de réponse. Une autre particularité est leur miniaturisation ainsi que leur capacité de détection simultanée de plusieurs analytes (Aroussi et Nabgha, 2020).
- **Le transducteur thermique** résulte du fait que la plupart des réactions biologiques s'accompagnent d'un dégagement de chaleur. Ils sont destinés à déterminer la concentration d'un substrat par la variation d'enthalpie associée à des réactions exo ou endothermiques (Aroussi et Nabgha, 2020).
- **Les transducteurs électrochimiques** sont des dispositifs qui convertissent l'interaction entre une substance à analyser (appelée analyte) et une électrode en un signal contenant des informations. Leur fonctionnement repose sur le fait que certaines molécules présentes dans la solution peuvent échanger des électrons avec la surface de l'électrode à un certain niveau de tension électrique (Marrakchi, 2006).

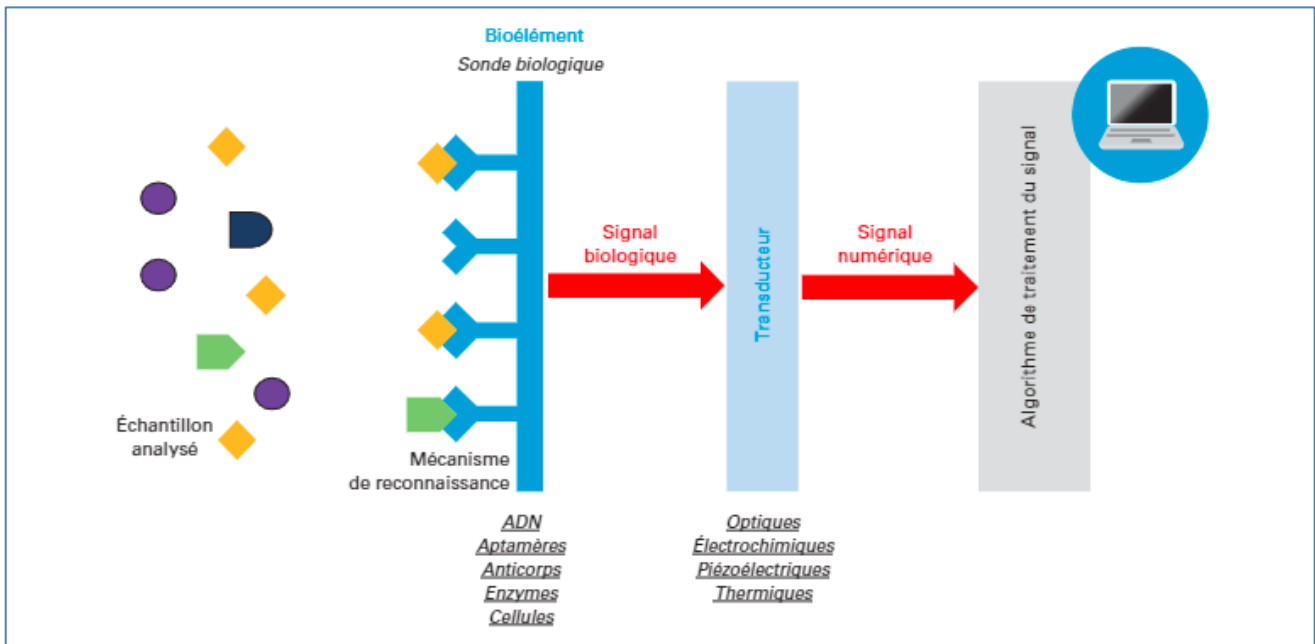


Figure 5 : Principe d'un biocapteur (Jouanneau, Thouand, 2019)

I.5 Les applications environnementales des biocapteurs bactériens

La surveillance environnementale nécessite des approches complémentaires aux méthodes physico-chimiques traditionnelles et les biocapteurs se révèlent être des solutions pertinentes pour cela. Grâce aux mécanismes de reconnaissance biologique qu'ils exploitent, ces outils offrent une perspective différente pour la métrologie environnementale. Ils permettent des méthodes simplifiées adaptées à une utilisation sur le terrain, ainsi que des mesures spécifiques telles que la biodisponibilité, la persistance et la toxicité des contaminants (Jouanneau, Thouand, 2019).

En plus des méthodes d'analyse environnementale traditionnelles, le développement des biocapteurs bactériens offre une alternative pour détecter la présence de certaines substances polluantes dans des échantillons naturels. Les techniques classiques appliquées actuellement pour échantillonner et analyser des sols et des eaux sont souvent coûteuses et longues à réaliser avec un nombre d'analyses souvent réduit à un strict minimum, de plus des processus complexes de prétraitement sont habituellement requis (La Colla et al., 2015). Et pour finir, la difficulté de l'analyse des métaux lourds dans l'eau de mer réside dans la concentration à l'état de traces du polluants et dans la forte interférence avec les sel (Cao et al., 2016).

Les biocapteurs bactériens offrent une alternative peu coûteuse et peuvent fournir des informations sur des polluants spécifiques présents dans un échantillon. D'autre part, les biocapteurs permettent une évaluation efficace du risque posé par un contaminant et

ouvrent la possibilité d'une bio remédiation (Billard et DuBow, 1998). En effet, les biocapteurs peuvent détecter non seulement la présence de ces substances, mais aussi leur biodisponibilité, c'est-à-dire la quantité de la substance qui est réellement disponible pour interagir avec les organismes vivants dans l'environnement. Par conséquent sans oublier leur mesure de l'impact toxicologique (Jouanneau, Thouand, 2019), les biocapteurs bactériens fournissent une méthode complémentaire et souvent plus sensible pour évaluer la présence et l'impact des substances polluantes dans les écosystèmes naturels (Rietti, 2001). Et pour finir, Les biocapteurs fournissent des signaux d'alerte précoce, permettant une intervention rapide avant qu'une petite fuite ne devienne un incident majeur et aident à minimiser l'impact sur les écosystèmes. Cette évaluation forme le fondement sur lequel repose la décision concernant l'utilisation future de remédiation d'un site pollué ainsi que les options envisageables car il est crucial de déterminer si les polluants sont accessibles aux organismes utilisés pour dégrader ces substances (Corbisier, 1997).

Néanmoins, la conception des biocapteurs bactériens est complexe et exige une compréhension approfondie du système biologique utilisé. La fiabilité des résultats dépend étroitement de l'état physiologique des cellules bactériennes, ce qui peut poser des défis en termes de reproductibilité. Mais il est possible d'utiliser différentes approches de détection pour leur conception notamment la détection fluorescente, colorimétrique et électrochimique (Raina, Kaur.2024) .

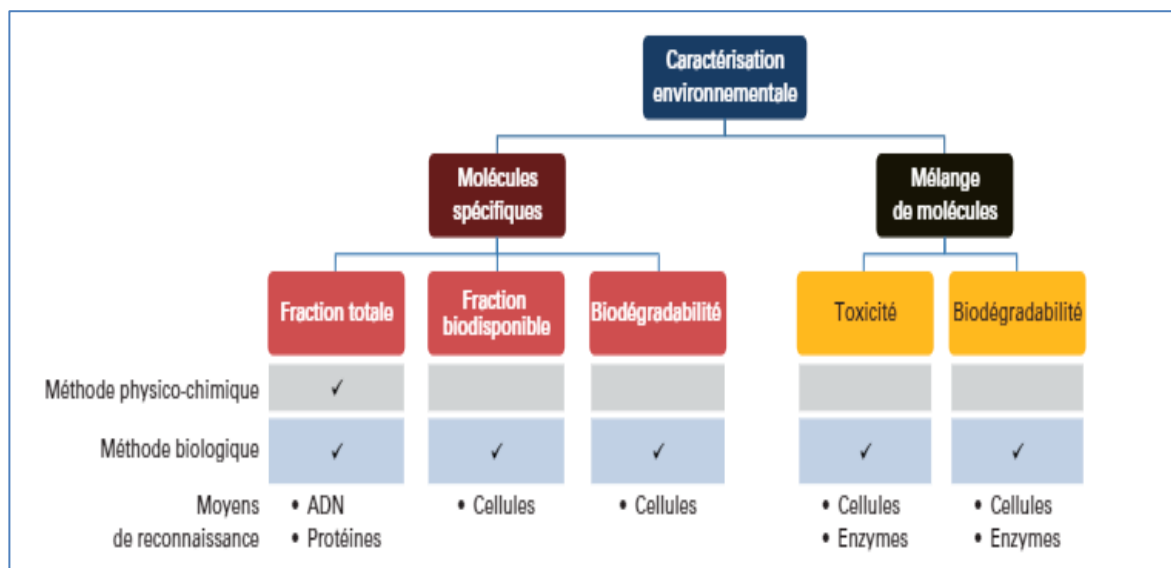


Figure 6: Champ d'action des biocapteurs et moyens de reconnaissance associés

(Jouanneau, Thouand, 2019)

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODE

II.1 Présentation de la zone d'étude

La zone d'étude est située sur une superficie comprenant le segment de Oued El Harrach allant de son intersection avec l'Oued Baba Ali jusqu'à son embouchure au niveau de la baie d'Alger, en passant par sa confluence avec l'Oued Samar (Fig.7). Ces Oueds sont exposés aux rejets de trois zones industrielles aux mêmes noms (ZI EN-Harrach, ZI Samar, ZI Baba Ali), en plus de la baie d'Alger qui constitue le milieu récepteur final des rejets continentaux transportés par le contributeur principal dans cette zone qui est Oued El-Harrach.

II.1.1 La baie d'Alger

La baie d'Alger est localisée au centre de la côte algérienne à l'Est de la plaine de Mitidja (Fig.7). Elle comprend 11 communes côtières situées dans la partie centrale de la côte algérienne entre les longitudes Est de 03°01'00" E à 03°14'30" E et les latitudes Nord de 36°44'30" N à 36°49'15" N, avec une superficie approximative de l'ordre de 180 Km² (Guendouzi). La baie d'Alger présente une forme semi-circulaire avec un diamètre d'environ 15,27 kilomètres et un périmètre côtier d'une longueur de 42,46 kilomètres. Celui-ci s'étire de l'est, au niveau du Cap Matifou (Tamentfoust), jusqu'à l'ouest, où se trouve la Pointe Pescade "Cap Caxine" (Rais Hamidou). Cette baie se distingue par une zone centrale de terrain plat, entourée d'une bande côtière encerclée par une chaîne de montagnes et des collines environnantes (Chemrouk, Chabbi. 2016 ; Rabehi, Guerfi et al. 2018). La baie d'Alger est confrontée à une série de perturbations anthropiques d'origine multiple, comprenant des sources domestiques, urbaines et industrielles. Deux cours d'eau traversent cette baie, l'Oued El Hamiz et l'Oued El Harrach, ce dernier étant principalement responsable du transport des effluents domestiques et industriels, en grande partie issus de la ville d'Alger.

II.1.2 Le bassin versant de l'oued El-Harrach

Le bassin versant de l'Oued El Harrach couvre une superficie d'environ 1200 km² où l'Oued El Harrach prend naissance à Bougara près de Hammam Melouane dans l'Atlas Blidéen qui est une partie de l'Atlas Tellien, au centre nord de l'Algérie (Fig.8). Il est l'un des plus importants cours d'eau de la plaine de la Mitidja avec une longueur totale d'environ 67 km, dont près de 18,2 km s'étendent dans la capitale jusqu'à son embouchure dans la baie d'Alger tandis que le reste traverse les wilayas de Blida et de Médéa (Fig 8 ; (W.Rabehi, M.Guerfi et al. 2018).

Les principaux affluents qui contribuent donc à l'écoulement des eaux vers l'Oued El Harrach comprennent :

- L'Oued Djamaa, originaire de l'Atlas Blidéen, avec un bassin versant de 225 km².

- L'Oued Baba Ali et l'Oued Terro, provenant de la Mitidja, avec un bassin versant de 166 km².
- L'Oued Smar, issu de la Mitidja, recevant les eaux des zones industrielles d'Oued Smar et d'El Harrach Sud, avec un bassin versant de 117 km².
- L'Oued El Kerma, provenant du sahel, avec un bassin versant de 74 km².
- L'Oued Ouchaiah, également issu du sahel, recevant les eaux des quartiers urbains densément peuplés tels que Kouba et Birkhadem, situés à un kilomètre de l'embouchure de l'Oued El Harrach, avec un bassin versant de 22 km².
- L'Oued Adda, recevant les eaux des quartiers urbains d'El Harrach et des Eucalyptus.

Ainsi, l'Oued El Harrach est alimenté par les apports de ses affluents mais également par les précipitations, les ruissellements, les eaux de mer refoulées ainsi que les eaux usées urbaines et industrielles. Sa capacité d'irrigation des terres agricoles avoisinantes est soutenue par ses affluents dont le plus important est l'Oued Smar en plus des oueds Djemâa, Bab Ali et El Terro. Il faut souligner que l'Oued El Harrach pose un grand risque pour la population d'Alger et une menace pour l'écosystème de la baie d'Alger, en raison de la présence d'un foyer de micro-organismes pathogènes et de substances néfastes. La croissance industrielle et démographique observée dans la région du bassin versant de l'Oued El Harrach témoigne clairement de l'accroissement de la pollution de ce cours d'eau où les eaux usées sont déversées directement sur les rivières sans traitement.

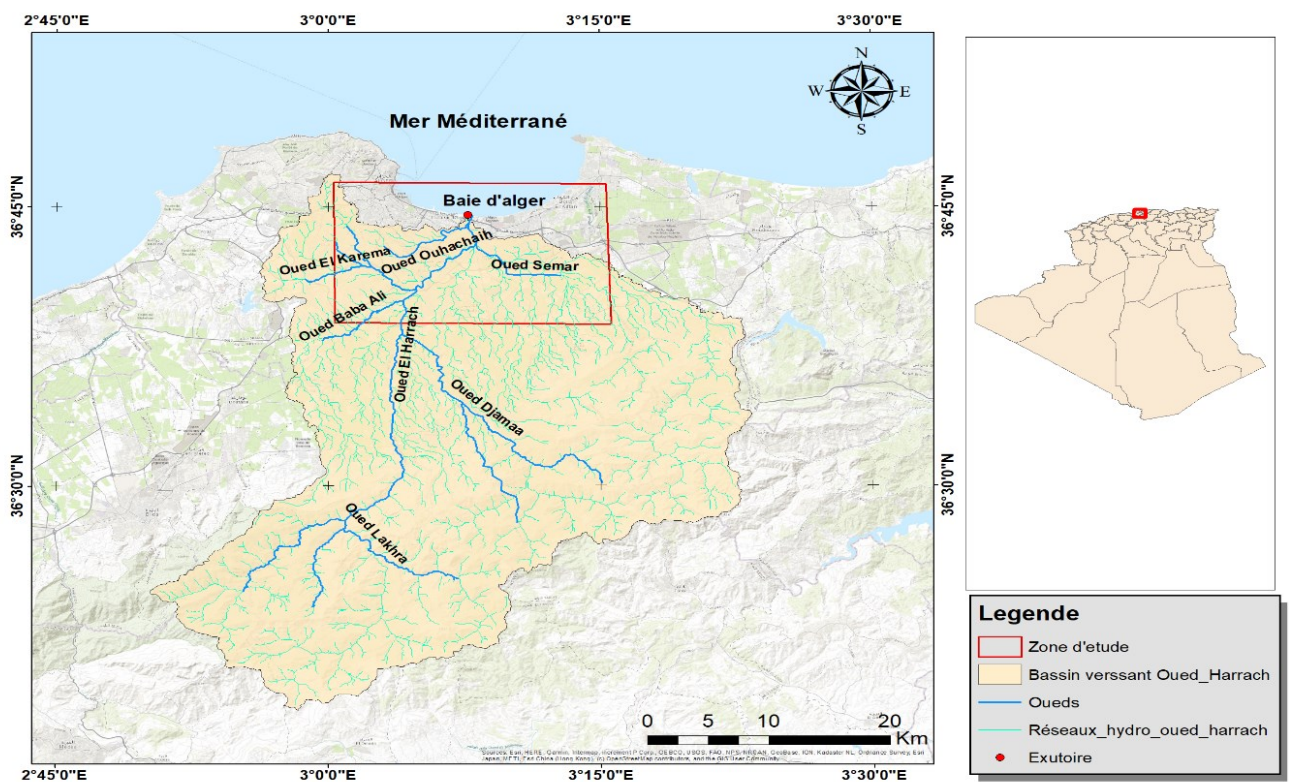


Figure 7: Situation géographique de la zone d'étude (Belhouadjeb R. et Guessab H. 2024)

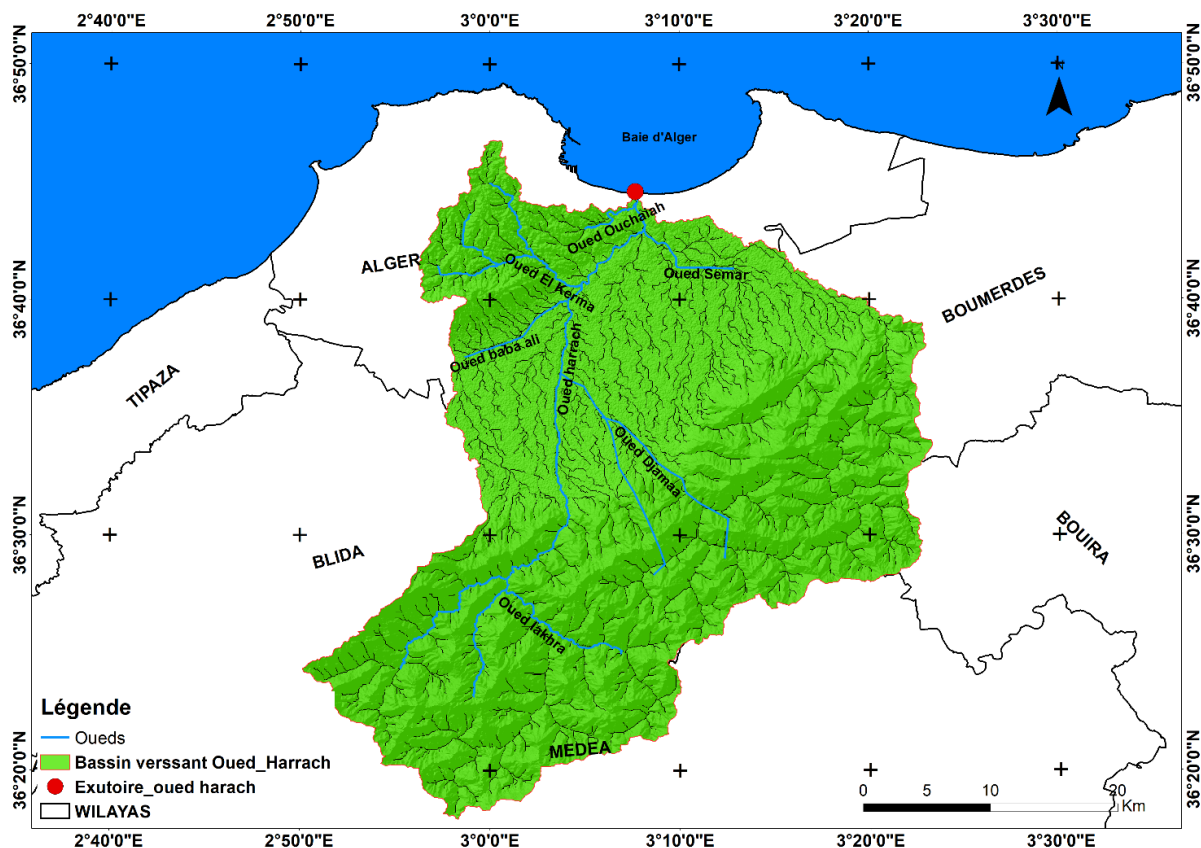


Figure 8: Carte du bassin versant Oued El Harrach

(W.Rabehi, M.Guerfi et al. 2018, Belhouadjeb et Guessab 2024)

II.1.3 Les sources industrielles des rejets des métaux

La croissance industrielle et démographique dans la région du bassin versant de l'Oued El Harrach a conduit clairement à l'accroissement de la pollution de ce cours d'eau et de ses affluents où des eaux usées sont souvent déversées directement sans traitement. En effet, l'Oued El Harrach présente une menace pour les écosystèmes terrestres et marins de la baie d'Alger ainsi qu'un grand risque sanitaire pour la population locale. Ceci est lié à la présence d'un foyer de micro-organismes pathogènes et de substances néfastes.

Les sources anthropiques de la pollution de l'Oued El Harrach sont principalement (i) le lessivage des pesticides chimiques par les surfaces cultivées (ii) les rejets d'eaux usées urbaines traitées ou non traitées ; (iii) les effluents bruts et/ou prétraités provenant des installations industrielles locales (Fig 9).



Figure 9: Point de rejet industriel dans l'Oued Baba Ali
(Belhouadjeb et Guessab 2024)

Ainsi, les eaux et les sédiments de l'Oued El Harrach ainsi que ses confluentes sont chargés de plusieurs types de polluants tels que les hydrocarbures et les métaux qui sont émis essentiellement par les zones industrielles El-Harrach, Smar et Baba Ali (Fig.10). En effet, des concentrations préoccupantes de métaux ont été trouvés dans les eaux et les sédiments de l'Oued et ses affluents, en particulier le plomb, le zinc, le chrome, l'arsenic et le mercure qui est une substance toxique particulièrement dangereuse pour l'homme (ONEDD et JICA, 2012 ; SIHE, 2013 ; Srir, 2014 ; Ben Halima 2023 ; Belhouadjeb et Guessab 2024).

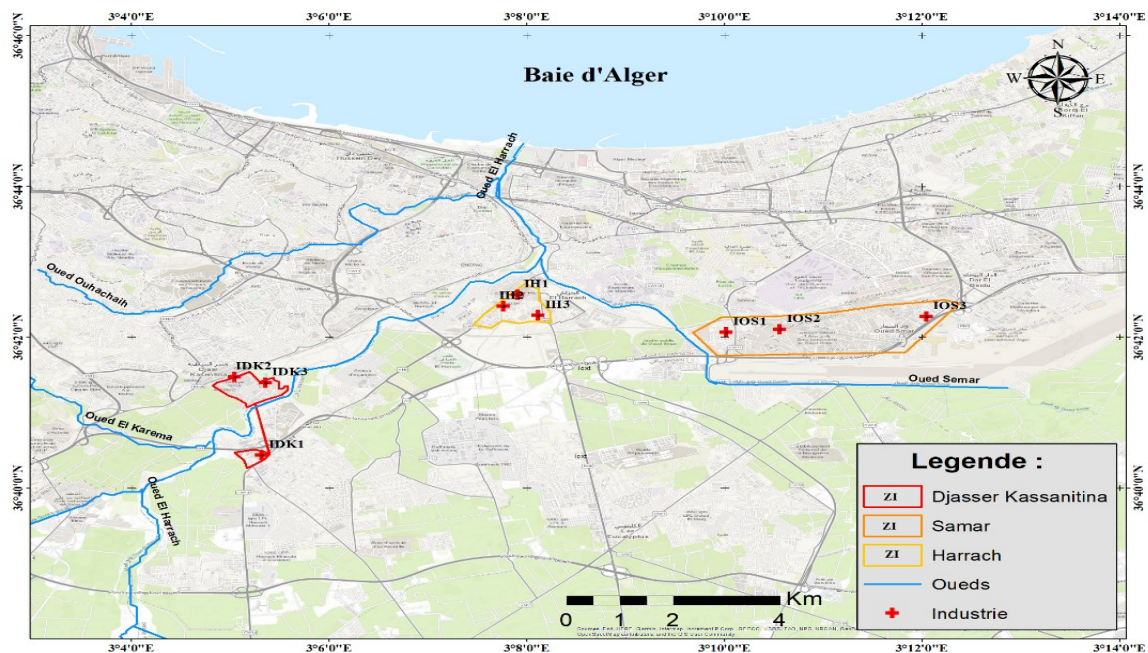


Figure 10: Les principales zones industrielles implantées dans la zone d'étude

(ONEDD et JICA, 2012 ; Belhouadjeb et Guessab 2024)

Les rejets de plusieurs activités appartenant à des secteurs industriels variés sont acheminés vers l'oued El Harrach et ses confluent avant d'arriver aux eaux marines de la baie d'Alger:

- Industries des combustibles (carbonisation, lavoir, pétrole, etc.)
- Industries métallurgiques des mines et transformation
- Industries chimiques (acides, bases, tels que engrais, savonneries, etc.)
- Industries pharmaceutiques et phytosanitaires
- Industries des bois, celluloses et papier,
- Industries textiles et des matières plastiques
- Industries Agro-alimentaires : laiteries, abattoirs, conserveries, féculeries, brasseries, pectineries, boyauderies, équarrissages, tanneries.

Le tableau 1 montre quelques exemples d'industries implantées dans cette zone d'étude.

Tableau 1 : Les principales unités industrielles du bassin d'oued El Harrach

Industrie	Activité
ENPEC Entreprise nationale de produits d'électrochimie	Fabrication d'accumulateurs de démarrage au plomb
ENAP Entreprise nationale de peinture	Fabrication de peinture
EPE CATEL SPA	Fabrication de câbles téléphoniques
AVENTIS PHARMA SAIDAL	Production de produits pharmaceutique
Sarl limonaderie Meiya	Boisson gazeuse
Sarl Vitamilk	Production de lait et dérivé
Sandoz	Fabrication de médicament
Spa PFIZER Saidal manufacturing	Fabrication de médicament
Sanofi Aventis	Fabrication de médicament et de vaccin
Sarl liko	Transformation de lait
Société d'application d'élastomères (SAEL)	Transformation du caoutchouc

II.2 Inventaire des émissions de métaux dans les rejets industriels et les milieux récepteurs

L'inventaire des émissions métalliques des activités industrielles ainsi que celui des concentrations des métaux dans les milieux récepteurs (eaux et sédiments) ont été basés sur la synthèse de données bibliographiques issues de plusieurs études menées dans cette région. En effet, plusieurs travaux ont été menés sur les rejets des zones industrielles de cette zone ainsi que l'état de pollution de l'Oued El-Harrach et ses confluent. Les résultats de ces travaux ont été obtenus grâce à l'utilisation de plusieurs moyens tels que l'enquête de terrain, les outils cartographiques ainsi que l'échantillonnage et les mesures géochimiques (Houas, JICA 2014, Morsli et Bouyakoub

2018, Kechidi 2014, Louati 2015) ainsi que par échantillonnage de 3 points de rejets sur les oueds Elharrach, Smar et Baba Ali, (Belhoudjeb et Guessab 2024).

Le tableau 2 montre la localisation de quelques sites industriels qui ont été identifiés comme émetteurs de métaux potentiels dans cette zone métropolitaine d'Alger (Belhouadjeb et Guessab 2024).

Entreprise	Type d'activité	Cordonné géographique
IH1	Production et commercialisation des produits de fonderie (pièces moulées en fonte, acier et métaux non-ferreux)	La : 36°42'35.19"N Lo : 3° 7'54.93"E
IH2	Production et commercialisation des engins	La : 36°42'27.50"N Lo : 3° 7'50.10"E
IH3	Production et commercialisation des chaudières	La : 36°42'18.14"N Lo : 3° 8'6.48"E
IOS1	Production de peinture	La : 36°42'4.56"N Lo : 3°10'1.35"E
IOS2	Produit de l'électrochimie (Batterie)	La : 36°42'6.40"N Lo : 3°10'33.83"E
IDK1	Transformation et commercialisation de produits à base de métaux précieux.	La : 36°40'26.30"N Lo : 3° 5'19.46"E
IDK3	Entreprise Nationale des Emballages Métalliques	La : 36°41'24.28"N Lo : 3° 5'21.55"E

Tableau 2 : Localisation de quelques sites industriels émetteurs de métaux dans la zone d'étude

II.3 Préparation des échantillons environnementaux

II.3.1 Choix des stations de prélèvements

Dans le cadre des prélèvements d'échantillons aquatiques pour l'étude des interactions des microorganismes aux métaux lourds, la sélection stratégique des sites de collecte doit être guidée par la proximité des déversements des effluents industriels.

En ciblant les stations proches des points de déversement, l'identification des bactéries résistantes aux métaux lourds permet la facilité de non seulement leur isolement et identification, mais aussi d'étudier leur réponse face aux différentes concentrations de stress métallique.

Ainsi, les points de prélèvement (Fig.11) ont été choisis au niveau de trois stations :

- la station 01 qui se trouve à Boumaâti aux coordonnées géographiques 36°42'51.3"N, 3°08'10.9"E. Cette station a été choisie du fait de son exposition observable à la pollution croisée de l'Oued El-Harrach et celle de Semar.

Les sources potentielles de la pollution métallique sont les déversements des effluents de l'entreprise de Chaudronnerie et de Ferblanterie (ECFERAL) ainsi que ceux de la fonderie (Fondal Spa).

- la station 02 qui est située sur Oued El Harrach aux coordonnées géographiques 36°43'19.8"N, 3°08'05.7"E. Cette station a été choisie pour sa localisation sur le principal cours d'eau de la wilaya d'Alger, qui est le collecteur de plusieurs types de pollution.
- la station 03 qui se trouve à Saoula sur l'Oued Baba Ali aux coordonnées géographiques 36° 40.97724' N, 3° 3.55716' E. La sélection de cette station s'est basée sur sa localisation au sein d'une agglomération industrielle, notamment l'entreprise du béton SARL BÉTON POINTE et le laboratoire pharmaceutique Frater Razes.



Figure 11 : Localisation des stations des prélèvements d'échantillons

II.3.2 Les conditions de prélèvement

Deux sorties de terrain ont été réalisées le 29/04/2024 (14h30) et le 15/05/2024 (10 h) au niveau de trois stations, situées sur Oued El-Harrach et ses deux confluent qui sont l'Oued Samar et l'Oued Baba Ali (Fig.12). Dès le retour au laboratoire, les échantillons d'eau et de sédiments ont été directement conservés dans le réfrigérateur à 2 °C pour les soumettre à l'analyse des éléments-traces métalliques (ETM) et à l'isolement des bactéries.



Figure 12: Les points de prélèvements

a.Boumaâti ; b. Oued El Harrach ; c. Baba Ali

II.3.3 La préparation des échantillons analytiques

Les flacons ont été préalablement décontaminés et stérilisés un jour avant leur utilisation, conformément aux protocoles appropriés. Ceux destinés à l'isolement des bactéries et l'étude de leurs interactions avec les (ETM) ont été soumis à un processus de stérilisation à l'autoclave à 121°C durant 15 minutes (Goullet, Deweerdt et al, 1996).

Les flacons destinés à la collecte d'échantillons pour l'analyse des métaux lourds ont été conditionnés selon les exigences spécifiques de cette analyse. Le nettoyage efficace est

crucial pour éviter la contamination des échantillons (CCME, 2011), ce nettoyage est particulièrement important lorsqu'on mesure des substances en très petites quantités tels que les métaux. Ceci permet d'enlever les résidus de fabrication de l'équipement neuf et de se débarrasser de la poussière et des débris sur l'équipement qui a été entreposé ou transporté pendant longtemps. Les échantillons prévus ont été prélevés dans des flacons en verres de capacités de 1 litre. Fermer hermétiquement toutes les bouteilles à l'aide de leur bouchon, et les placer en position verticale dans la glacière pour la durée du transport, et par la suite ils ont été acheminés au laboratoire et ont été conservés à +4°C.

L'isolement a été réalisé immédiatement une fois les échantillons arrivés aux laboratoires après le prélèvement.

II.3.4 L'isolement et l'identification des bactéries

L'isolement permet d'obtenir les cultures pures indispensables à toute étude et identification bactériologique (Marchal et al., 1991), Le but de l'isolement bactériologique est d'obtenir des souches pures des bactéries résistantes aux métaux lourds des eaux polluées. Ensuite de les identifier et de réaliser des essais de leur croissance en présence de différentes gammes de concentration des différents métaux.

II.3.4.1 La technique d'isolement

- **La préparation des solutions filles de dilution décimale à partir des échantillons :** un volume de 90 ml d'eau distillée a été ajouté dans des flacons stérilisés dans un autoclave. Ensuite, 10 ml de la solution mère, c'est-à-dire l'échantillon initial, ont été incorporés (Fig.13). Cette opération permet d'obtenir une dilution décimale de 10^{-1} . Selon le même principe, une seconde dilution de 10^{-2} a été réalisée. Cette étape a été réalisée pour chaque échantillon (C.Delarras,2007) .

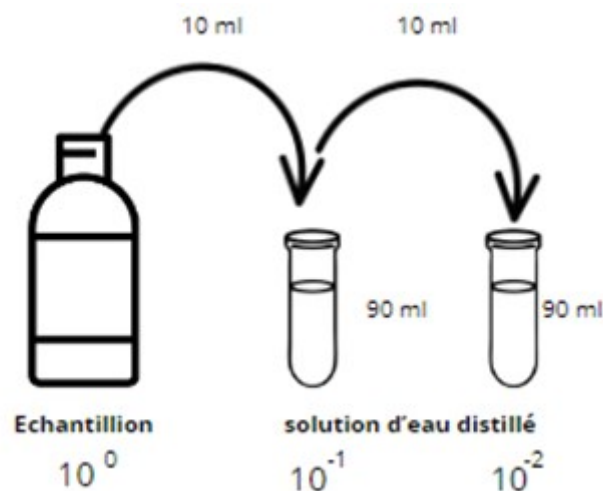


Figure 13 : Schéma de la préparation de solutions filles de dilution

Dans la zone stérile et à l'aide d'une pipette graduée stérilisée, un prélèvement de 1 ml a été effectué sur chaque échantillon préparée ainsi que sur leur solutions filles de dilution et ensemencées à la surface dans chaque milieu de culture bactériologiques préparés : Gélose au Tergitol ; TCBS ; mannitol ; cetrimide ; sabouraud (annexe 1). Ensuite, incuber dans l'étuve bactériologique et réglée à la température de 37 C° pendant une durée de 24 à 72 heures (Willey, Sherwood et all, 2011).

La purification et l'isolement : Les germes présents dans l'environnement se trouvent souvent sous forme de mélanges de plusieurs espèces. La pureté a été vérifiée par observation microscopique afin de confirmer l'uniformité morphologique des bactéries (Willey, Sherwood et all, 2011). Pendant l'incubation, chaque micro-organisme déposé se multiplie pour donner un clone de cellules identiques. Cette opération permet une croissance d'une culture pure d'une souche bactérienne en formant une colonie (Benaissa 2022).

Après une incubation de 24 à 72 heures à 37 °C, la croissance bactérienne ainsi que les caractéristiques des colonies existantes ont été notées. Les colonies bien définies et non contaminées par d'autres colonies ont été sélectionnées. Chaque colonie a été prélevées à l'aide d'une anse à platine, réisolées par épuisement de l'inoculum prélevé en l'étalant sous forme de stries à la surface de la nouvelle boîte de pétrie.

II.3.4.2 L'identification bactériologique par caractérisation morphologiques, physiologiques et biochimique

L'identification des souches bactériennes isolées obtenues s'est basée sur la détermination des caractères morphologiques qui constituent des critères d'orientation très importants de l'identification bactérienne ainsi que sur les caractères physiologiques et biochimiques (Marchal et al., 1988).

La détermination des caractères morphologiques

L'aspect et l'apparence des colonies bactériennes isolées varient selon le type de milieu utilisé, la durée et la température d'incubation. Plusieurs critères sont considérés:

- La taille des colonies est appréciée selon leur diamètre. Une colonie est dite petite si son diamètre ne dépasse pas 1 mm, Moyenne un diamètre entre 1 et 3 mm et grande pour Plus de 3 mm de diamètre.
- L'allure des contours où les bords des colonies peuvent présenter différents aspects. Ils peuvent être lisses et réguliers ou irréguliers avec des extrémités

déchetées pouvant même présenter parfois des prolongements. Certaines colonies peuvent envahir le milieu de culture de manière diffuse.

- La forme du relief qui donne l'apparence de colonies plates, bombées ou demi-bombées avec le centre de la colonie pouvant être surélevé ou ombiliqué.
- La transparence qui influence l'aspect général d'où l'existence des colonies transparentes, translucides, lactescentes ou opaques.
- L'aspect de la surface qui induit des colonies lisses, rugueuses ou muqueuses.
- La pigmentation, même si de nombreuses colonies n'ont pas une couleur distincte et apparaissent blanches ou grises, certaines bactéries produisent des pigments insolubles, donnant à leurs colonies des couleurs spécifiques comme le rose, le jaune ou le rouge. D'autres bactéries produisent des pigments solubles qui se diffusent et colorent le milieu de culture (Benaïssa .2020).

L'observation microscopique des préparations bactériennes permet de faire une étude morphologique des cellules bactériennes. Dans ce travail, l'observation à l'état frais et la Coloration de Gram ont été utilisés pour l'étude morphologique des cellules bactériennes.

- **L'observation à l'état frais** : cet examen microscopique sur des bactéries vivantes est réalisé entre lame et lamelle, il permet de déterminer la forme, le mode de groupement et leur mobilité si visible. Les bactéries sont considérées mobiles, lorsque des trajectoires très différentes sont observées par des déplacements dans toutes les directions (Benaïssa 2022). Une goutte d'eau distillée stérile est déposée au centre de la lame, puis déposer une lamelle au-dessus en évitant de créer des bulles d'air. On observe au microscope optique à l'objectif GX40.
- **La coloration de Gram** : développée en 1884 par le médecin danois Christian Gram, cette méthode de coloration est la plus largement utilisée en bactériologie. C'est une coloration différentielle qui permet de Classifier les bactéries en 2 catégories les bactéries Gram + et les bactéries Gram- . La coloration de Gram permet de détecter la morphologie bactérienne et d'observer le mode de regroupement. Le mode opératoire a été suivi selon ces étapes (Willey, Sherwood et all, 2011):
 - **La préparation du frottis** où les bactéries sont étalées sur une lame propre et en laissant sécher et fixer physiquement l'étalement.
 - **La coloration** où le violet de gentiane est appliquée sur le frottis pendant 1 minute, ensuite le colorant est rincé. Le but de cette étape est d'obtenir une coloration primaire.
 - **La fixation** où le lugol est appliqué pendant 1minute pour fixer le frottis, ce colorant agit comme un mordant en augmentant les interactions avec la cellule pour qu'elle soit plus fortement contrastée. Ensuite le frottis est rincée pour le débarrasser du colorant.
 - **La décoloration** où le frottis est décoloré avec un mélange d'alcool et d'acétone pendant 15 secondes. Ensuite le frottis est rincé. Cette étape engendre l'aspect

différentiel de la coloration de Gram ; les bactéries Gram-positives gardent le violet de gentiane, tandis que les bactéries Gram-négatives le perdent et se décolorent

- **La coloration différentielle** où le frottis est coloré à la fuchsine pendant 1 minute. Cette étape colore les bactéries Gram-négatives en rose pendant que les bactéries Gram-positives sont colorées en violet foncé.
- **L'observation** où la lame est examinée au microscope en utilisant les objectifs (x40, x100). Les bactéries Gram négatif apparaissent en rose rouge. Elles sont décolorées par l'alcool et teintées par la fuchsine diluée.

La détermination des caractères physiologiques

L'étude des caractères physiologiques consiste à examiner et à analyser les fonctions biologiques et les activités métaboliques des organismes vivants, à l'aide de plusieurs tests.

- **Le test de la catalase** permet de détecter la présence de l'enzyme catalase dans une souche bactérienne en catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Guiraud et al, 1998). Une goutte de peroxyde (eau oxygénée) est placée sur une lame de microscope. Avec l'anse a platine stérilisé, un prélèvement de la colonie bactérienne purifié est déposé sur la goutte de peroxyde. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase.
- **Le test de l'oxydase permet** d'identifier un type spécifique de chaîne respiratoire chez les bactéries, qui peut oxyder des composés chimiques tels que le réactif d'oxydase de Kovacs, produisant une couleur violette intense. Le disque d'oxydase est déposé stérilement au centre d'une lame propre (Benaissa 2022). Un fragment de colonie bactérienne (culture fraîche) est prélevé, ensuite recueilli sur la surface de la gélose avec l'anse a platine et étalé sur le disque. En lecture, les espèces oxydase-positives donnent une coloration violette immédiatement ou dans les 10 secondes.

La détermination des caractères biochimiques

L'importance des tests métaboliques réside dans le fait qu'ils permettent de distinguer des bactéries très apparentées par la recherche de certains indices tels que la présence de certaines enzymes, la dégradation de l'urée et l'esculine, la transformation du lactose et la production de gaz, l'utilisation du citrate, la production d'acétone ainsi que l'utilisation de différents sucres comme source de carbone.

Le principe a été miniaturisé dans des galeries spécialisées API (Appareils et Procédés d'Identification). Pour les entérobactéries, API 20 E est habituellement utilisée avec une série de 20 tests pour mettre en évidence les caractères biochimiques des bactéries a

gram négatif. Les profils biochimiques ou numériques sont interprétés à l'aide de tableaux, de catalogues analytiques ou de logiciels (Touaitia 2024).

Le mode opératoire a été suivi selon ces étapes :

- **Préparation de l'inoculum** : dans la zone stérile, une suspension bactérienne est préparée en ensemencant l'eau distillée d'un tube stérile avec une colonie bactérienne issue d'une culture pure prélevée stérilement avec une pipette Pasteur.
- **Préparation de la galerie**: une atmosphère humide est créée en réunissant le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation et en répartissant de l'eau dans les alvéoles.
- **Inoculation de la galerie : l'ensemencement** de tous les tubules du type ADH et les cupules des tests sont ensemencées avec une pipette Pasteur stérile. Les cupules sont remplies avec de l'huile de paraffine, pour créer l'anaérobiose.
- **Incubation** : la plaque est prête pour incubation à 35- 37 °C (API 20 E) pendant 18-24 heures (Fig. 14).



Figure 14: Aspect de la galerie API 20 E après l'inoculation

La lecture des résultats se fait par lecture directe pour les réactions spontanées, et indirecte en ajoutant les réactifs nécessaires aux puits correspondants pour détecter les produits métaboliques particuliers. En effet, le réactif TDA est ajouté dans la cupule TDA, le réactif de Kovacs dans la cupule IND et le réactif VP1 puis VP 2 dans la cupule VP. En attendant 10 minutes, la lecture du résultat des réactions (positives ou négatives) se fait en fonction des variations de couleurs.

L'interprétation des résultats est réalisée à l'aide d'un classeur Excel qui permet l'identification d'une souche microbienne à partir de son profil obtenu automatiquement. Par conséquent l'identification précise des espèces et la

détermination de la souche la plus probable. Toutes les souches identifiées ont été conservés par ensemencement sur des tubes de conserve.

II.4 Evaluation de l'interaction des bactéries avec des métaux

La réactivité des bactéries aux métaux lourds a été évaluée par estimation de leur croissance à partir des tests d'absorbance optique. Ces tests ont été menés sur la culture des différentes souches bactériennes obtenues après leur isolement et leur purification. Les valeurs variables de la densité optique obtenues ont été considérées comme des réponses biologiques des souches bactériennes à l'exposition aux différentes concentrations des métaux.

II.4.1 Préparation du milieu de culture avec des concentrations variables des métaux

Le Milieu employé lors de cette étude est le milieu liquide Mueller Hinton MH (annexe 1), ce milieu est destiné pour les bactéries autres que celles à croissance lente tel que les Entérobactéries et Pseudomonas (CASFM / EUCAST, 2021).

Trois métaux différents en état de sel ont été sélectionnés : le Chlorure de cadmium ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$), le nitrate de cobalt(II) $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et le Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Pour la préparation de cinq concentrations variables (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 3200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ; différentes masses ont été pesé pour avoir les concentrations voulus . Une série de 6 tubes à essai a été stérilisée à 121 C° pendant 15 minute. Un volume de 10 ml des solutions préparées a été versé dans chaque tube à essai de la série.

La réactivité des souches identifiées et isolées a été donc testée avec trois, à savoir le cuivre le cobalt et le cadmium. Ces métaux ont été identifiés parmi les polluants présents avec des concentrations plus ou moins élevées dans les effluents industriels et les oueds de la zone d'étude. Le cuivre et le cobalt sont des éléments de traces qui sont essentiels pour de nombreux organismes mais peuvent être toxiques à des concentrations élevées. En revanche le cadmium est un métal qui est non essentiel et hautement toxique. Le choix des métaux testés a été également selon la disponibilité des sels métalliques au laboratoire ainsi que leur facilité d'être solubilisés dans les bouillons nutritifs.

II.4.2 Préparation de l'inoculum bactérien

Des tubes à essai contenant 10 ml du milieu MH stérile ont été inoculés par quelques colonies bactériennes pour chaque espèce isolée et conservé précédemment, puis incubés à 30°C pendant 18h pour les réactiver et avoir des souches bactériennes jeunes.

Dans cette partie de l'étude, six souches bactériennes conservées ont été utilisées pour l'étude de la sensibilité aux éléments traces métalliques (ETM). Ces souches, identifiées

lors de l'étape précédente, incluent deux souches sélectionnées pour chaque site de prélèvement.

Les tubes contenant différentes concentrations de métaux ont été inoculés avec 1 ml des tubes inoculés. Chaque espèce bactérienne a été introduite dans chacun des cinq niveaux de concentration de chaque métal utilisé. Les cultures ont été incubées à 30 °C pendant 72 heures.

Durant la préparation des milieux de culture, des blancs analytiques pour chaque concentration ont été effectués qui vont servir à la lecture des résultats. Ainsi une autre série de 6 tubes à essai ne contenant que le milieu MH sans les métaux a été considérée comme témoins positifs de la croissance bactérienne A0.

II.4.3 Observation de la croissance bactérienne par spectrophotométrie

L'observation des résultats de la croissance bactérienne a été faite par la mesure de la densité optique (DO) des cultures à une longueur d'ondes de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le spectrophotomètre fonctionnant dans le domaine ultraviolet-visible (UV-Vis) utilise une source lumineuse dans la longueur d'onde se situe dans la gamme de l'UV ou du visible (généralement de 190 à 900 nanomètres) pour éclairer un échantillon. Les instruments mesurent ensuite la lumière absorbée transmise ou réfléchi par l'échantillon à chaque longueur d'onde.

La mesure de la turbidité (trouble en suspension en densité optique) par spectrophotométrie à UV (quantité de lumière qui peut traverser un échantillon) est une des différentes techniques existantes de dénombrement (Benaïssa, 2022).

Mode opératoire :

- Préparer les cuves de mesure propre pour échantillon liquide du spectrophotomètre, Il convient de conserver des fenêtres optiques aussi propres que possible et de ne jamais les toucher.
- Récupérer les tubes précédant contenant l'inoculum en présence des métaux, ainsi que les blancs analytiques pour chaque concentration de métal donné.
- Allumer l'appareil et attendre qu'il se calibre, généralement ceci prend quelques minutes. Sélectionner la longueur d'onde qui est de 620 nm (Bury-Moné, 2007)
- Agiter chaque tube avant de le verser dans une cuve et de lire son absorbance pour qu'il soit homogène.
- Remplir les cuves avec les milieux. Les cuves doivent être remplies jusqu'à un niveau approprié généralement environ $\frac{3}{4}$. Le milieu ne doit pas toucher les bords de la cuve.
- Placer une cuve contenant le blanc qui convient à une concentration donnée d'un métal donné dans le spectrophotomètre. Cette étape sert à calibrer l'appareil.

- Réglage de l'appareil au 0 du blanc utiliser, cela ajuste l'appareil pour qu'il reconnaisse l'absorbante du blanc comme 0.
- S'assurer que la surface extérieure de la cuve soit propre et sèche et mettre l'orientation de la cuve de face plane, aligné et orienté correctement avec le faisceau lumineux de la spectrophotométrie, celui-ci doit passer horizontalement à travers la cuve.
- Mesurer l'inoculum de chaque espèce bactérienne en insérant les cuves contenant les milieux avec la même concentration du métal du blanc.
- Mesurer d'absorbance et noter les valeurs de chaque espèce.

Note : l'inoculum bactérien préparé lors de la première étape (destiné à être incorporé sur les solutions contenant les métaux) a des concentrations bactériennes qui sont estimées selon cette règle empirique : pour une longueur d'onde de 600 nm, 1 UA (Unité d'Absorbance) correspond classiquement à 5×10^8 UFC/mL (UPBM, 2013).

Après la préparation des inoculums, la densité optique de chaque échantillon a été mesurée afin de déterminer la concentration bactérienne. Les résultats ont montré une concentration moyenne de $6,375 \times 10^8$ UFC/mL.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1 Inventaire des émissions métalliques

III.1.1 Les concentrations de métaux dans les rejets industriels

Les concentrations des métaux dans les effluents industriels ont été collectées à partir des données publiées dans d'autres études sur les zones industrielles principales dans cette région (cf. II.1.3, Fig. 15). Le graphique de la figure 14 montre les émissions métalliques majoritaires dans les effluents de plusieurs industries de la région où les principaux milieux récepteurs des rejets prétraités ou sans traitement sont Oued El Harrach et ses confluent, notamment Oued Smar et Oued Baba Ali. Ainsi, on constate que les concentrations des métaux dans les rejets sont variables et en fonction des types d'activités industrielles. Le graphique montre une prédominance des émissions du fer par les industries de métallurgie et d'autres activités comme l'usine Hydrotaraitement où la concentration de ce métal dans le rejet atteint 887 mg/l. Ses concentrations sont également les plus élevées pour le plomb et le zinc avec 22 mg/l et 54 mg/l respectivement. Pour le chrome, c'est le rejet de l'usine qui a la plus forte concentration avec 60,43 mg/l.

Il faut souligner que ses concentrations sont ponctuelles et ne peuvent pas rendre compte avec plus de précisions, des flux totaux annuels des émissions métalliques d'origine industrielle dans le bassin versant d'Oued El-Harrach. L'annexe 5 présente des concentrations de métaux dans les rejets industrielles de plusieurs industries dans cette région.

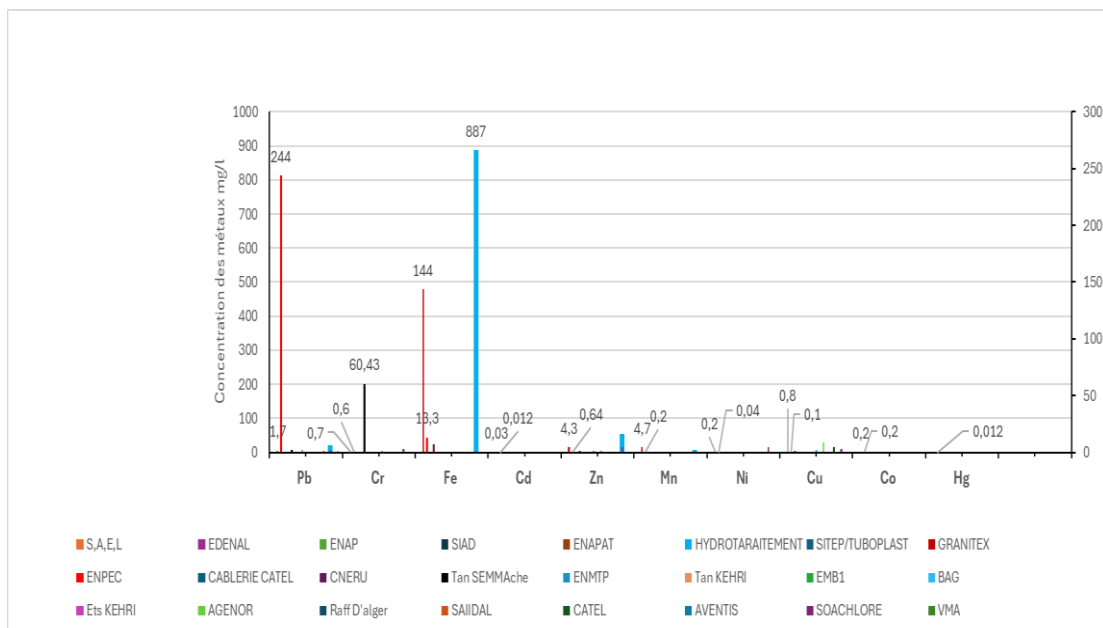


Figure 15: Concentrations de métaux dans les rejets industriels

III.1.2 Les concentrations de métaux dans les eaux

Le graphique de la Fig 16 illustre la concentration de plusieurs métaux lourds (Cd, Cr, Cu, Mn, Ni) dans les eaux de différents sites situés le long de trois oueds (Oued El Harrach, Oued El Samar, Oued Baba Ali) en Algérie

Des niveaux préoccupants de cadmium (Cd), en particulier dans les points OB7 et OB8 situés le long de l'Oued Baba Ali, où les concentrations dépassent largement celles observées dans les autres oueds. Cette valeurs indiquer une pollution industrielle et une mauvaise gestion des rejets dans cette région.

Le chrome (Cr) montre également des pics significatifs dans les points OH2 (Oued El Harrach) et OS5 (Oued El Samar).

le cuivre (Cu), le manganèse (Mn) et le nickel (Ni) sont présents à des concentrations relativement faibles.

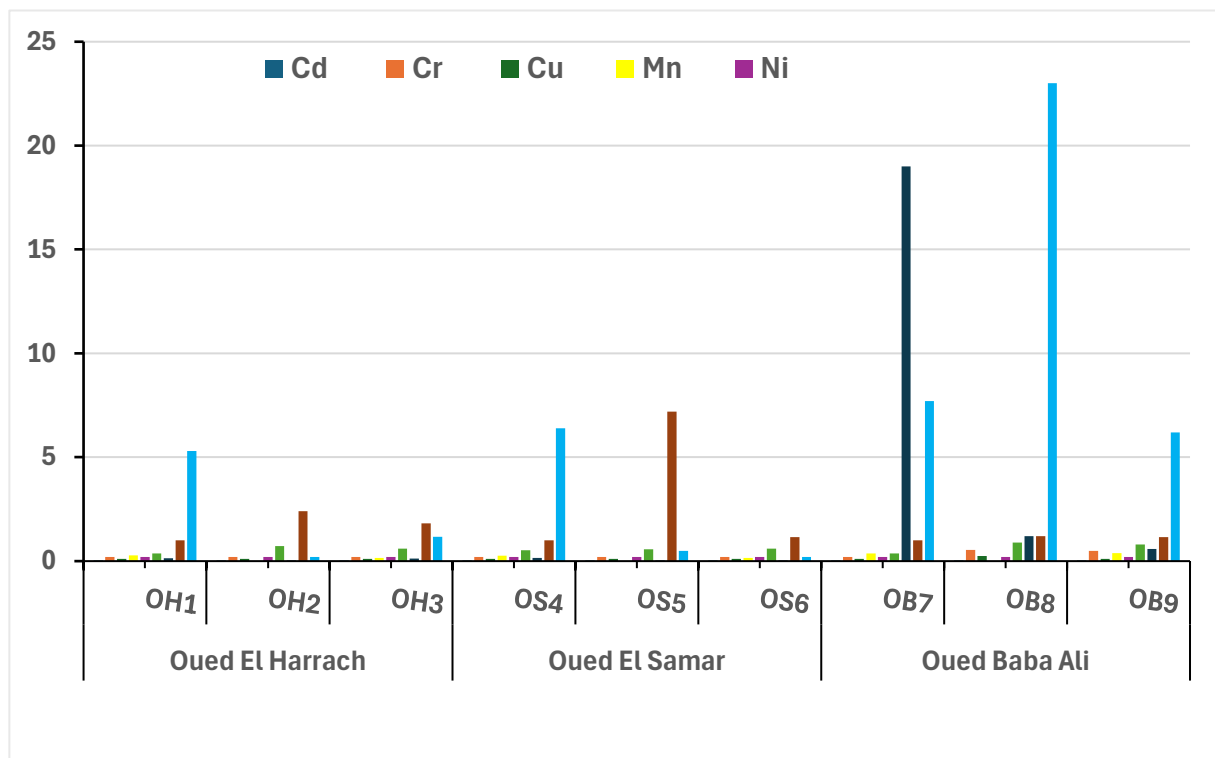


Figure 16: Concentrations de métaux dans les eaux de l'Oued El-Harrach et ses confluent

III.1.3 Les concentrations de métaux dans les sédiments

Le graphique de la fig 17 montre la concentration de plusieurs métaux lourds (Zn, Mn, Cu, Pb, Cr et Fe) dans les sédiments de différents points de prélèvement répartis le long de trois oueds en Algérie : Oued El Harrach, Oued El Samar, et Oued Baba Ali. Contrairement aux graphiques précédents, il intègre aussi la concentration en fer (Fe) sur un second axe des ordonnées (à droite), avec des valeurs élevées indiquées par des annotations en orange.

Le fer et le zinc sont présent à des niveaux alarmants, avec des concentrations supérieures à 300 mg/L et 20 mg/L respectivement dans plusieurs points

Des concentrations relativement faibles de cuivre, plomb et chrome sont observées dans tous les oueds.

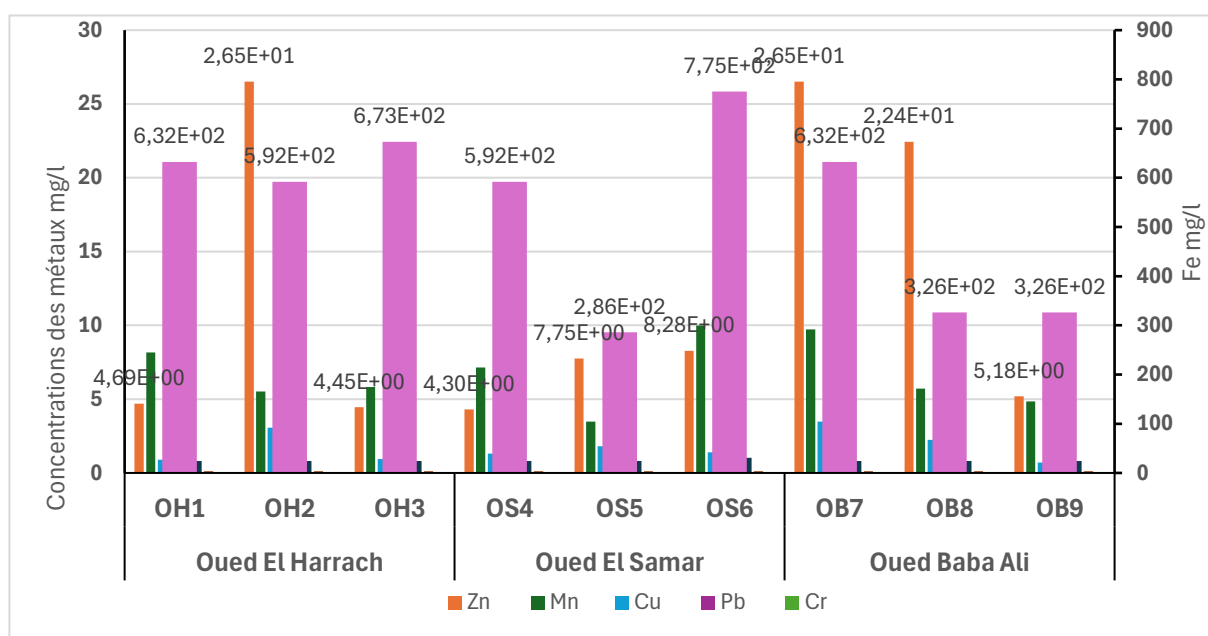


Figure 17: Concentrations de métaux dans les sédiments de l'Oued El-Harrach et ses confluent

III.2 Isolement et identification de la flore bactérienne

III.2.1 Identification morphologique des souches bactériennes

L'identification morphologique des souches bactériennes s'est basée sur les aspects macroscopiques et microscopiques. L'identification a été effectuée après avoir purifié les

colonies qui ont été isolées à partir des différents milieux de culture pour chaque station de prélèvement. Les résultats sont représentés dans le tableau 3.

Ce tableau présente les observations microbiologiques des souches bactériennes provenant des 3 stations différentes (Boumaâti, Oued El Harrach et Oued Baba Ali). Ces souches ont été isolées dans différents milieux de culture (Cétrimide, TCBS, Tergitol, Mannitol et Sabouraud). les observations incluent des descriptions macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes.

Tableau 3: observations macroscopiques et microscopique des cultures bactériennes

Station de prélèvement	Milieux	Code	Observation macroscopique	Observation microscopique
la station 01 Boumaâti	Cétrimide	A1	Petites colonies blanches à contour irrégulier	Coccobacille à Gram -
	TCBS	B1	Colonies de couleur verte bombée à contour régulier	Bacilles à Gram -
	Tergitol	C1	Colonies orange et bombée à contour régulier	Bacilles à Gram -
la station 02 Oued El Harrach	Cétrimide	A2	Colonies de couleur vert vif avec aspect muqueux irrégulier	Bacilles à Gram -
	Mannitol	B2	Petites colonies jaunes à contour régulier	Bacilles à Gram +
	Sabouraud	C2	Petites colonies blanches à contour régulier	Bacilles à Gram -
La station 03 Oued Baba Ali	Cétrimide	A3	Colonies blanches à contour régulier	Bacilles à Gram -
	Mannitol	B3	Colonie rose à contour régulier	Coccobacilles à Gram -
	TCBS	C3	Petites colonies jaunes à contour régulier	Bacilles à Gram -

III.2.2 Recherche de l'oxydase et de la catalase

Le test de la catalase détermine la présence de l'enzyme catalase qui décompose le peroxyde d'hydrogène en H₂O et O₂ un résultat positif indique que la bactérie possède cette enzyme. Le résultat négatif indique l'absence de l'enzyme.

Le test de l'oxydase détermine la présence de l'enzyme cytochrome oxydase dont le résultat positif indique que la bactérie possède cette enzyme souvent associée à des bactéries aérobies telles que la Pseudomonas. Le résultat négatif indique l'absence de

cet enzyme. Les résultats des tests de la recherche de la catalase et de l'oxydase des souches bactérienne à gram négatif sont mentionnés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats de la recherche d'oxydase et de catalase.

Station de prélèvement	Milieux	Code	Catalase	Oxydase
La station 01 Boumaâti	Cétrimide	A1	+	+
	TCBS	B1	+	-
	Tergitol	C1	+	-
La station 02 Oued El Harrach	Cétrimide	A2	+	+
	Sabouraud	C2	+	-
La station 03 Oued Baba Ali	Cétrimide	A3	+	+
	Mannitol	B3	+	-
	TCBS	C3	+	-

(+) : Résultat positif (-) : Résultat négatif

III.2.3 Identification biochimique

Le tableau 5 représente les résultats de la lecture de la galerie API 20 E des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage et après l'incubation pendant 24 heures à 30°C. Les résultats positifs et négatifs de chaque test sont utilisés pour former un profil unique pour une espèce bactérienne. Ce profil est ensuite comparé à une base de données pour déterminer l'espèce et le genre les plus probables de la bactérie.

Les tests présents dans la première ligne (ONPG, ADH...) déterminent les capacités métaboliques des bactéries qui sont essentiels pour l'identification précise des espèces en utilisant la galerie API 20E, Chaque test positif ou négatif contribue à un profil qui est ensuite utilisé pour l'identification.

La liste des tests la galerie API 20E avec leur nom complet, leurs abréviations et ainsi la description de chaque test sont mentionné dans l'annexe 1.

Tableau 5: Profil biochimique sur la galerie API 20 E des souches isolées

Code	ONP	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂
A1	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
B1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
C1	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A2	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
C2	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

A3	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C3	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

L'introduction des profils précédents dans un système automatisés (classer Excel) pour chaque espèce isolée inconnue, présentée sous forme d'un code indiquant la zone de prélèvement et le milieu de culture utilisé, a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 6 :

Tableau 6: Résultat de l'identification biochimique des souches isolées par l'API 20 E

Code	Identification	Pourcentage d'identification %
A1	<i>Aeromonas Hydrophila gr.1</i>	91 %
B1	<i>Escherichia coli</i>	98 %
C1	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99 %
A2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81 %
C2	<i>klebsiella pneumoniae</i>	98 %
A3	<i>citrobacter freundii</i>	85 %
B3	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	46,9 %
C3	<i>Enterobacter cloacae</i>	95 %

Les pourcentages d'identifications aident à évaluer la fiabilité des identifications fournies par le système.

Les résultats obtenus ont révélé des pourcentages d'identification de modérée à élevée pour la plupart des espèces (>70%), indiquant une identification fiable. Cependant, l'espèce *Pseudomonas oryzihabitans* a présenté un pourcentage d'identification non fiable de 46,9 %. Cela signifie que le profil biochimique de cette souche ne correspond pas bien au profil de la base de données et donc son identification est moins certaine.

Aeromonas hydrophila

Aeromonas hydrophila appartient à la famille des Aeromonadaceae. Ce sont des bacilles à Gram négatif, non capsulés et mobiles. Parfois coccobacillaires, ces bactéries sont aérobie-anaérobies facultatives. Elles se trouvent principalement dans les eaux douces, notamment dans les eaux souillées, et ont une distribution géographique mondiale. Elles peuvent se multiplier à des températures aussi basses que +4°C (Fiche Technique Bactériologie, 2010).

Les études montrent que les souches d'*Aeromonas hydrophila* résistantes aux antibiotiques et aux métaux lourds forment des biofilms et produisent du slime sur l'agar Congo red agar (CRA). Le slime joue un rôle dans la protection de l'environnement aquatique des effets sélectifs des antibiotiques et des métaux lourds mais aussi dans la résistance de ces bactéries aux antibiotiques en les empêchant de les atteindre dans les biofilms. Saidi, Lagha et al., 2013).



Figure 18: Profil biochimique de l'espèce *Aeromonas Hydrophila*

✚ *Escherichia coli* (*E. coli*)

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie coliforme thermotolérante appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Elle se trouve couramment dans le tube digestif des humains et des animaux à sang chaud. D'origine fécale humaine ou animale, et donc elle n'existe pas naturellement dans l'environnement, ce qui en fait un indicateur de la qualité des eaux. Cependant, elle peut survivre quelques mois dans l'eau (WHO, 2011). Un des mécanismes de résistance d'*E. coli* aux métaux lourds est la biosorption passive des cations sur les groupements fonctionnels membranaires de la bactérie (Desaunay, 2012) et la principale protéine qui sert de résistance au cuivre est CueO, une oxydase multicuivre qui fait partie d'un mécanisme de résistance au cuivre (Loutet et al, 2015).



Figure 19: Profil biochimique de l'espèce *Escherichia coli*

✚ *Raoultella ornithinolytica*

Raoultella ornithinolytica est un bacille à Gram négatif, immobile et capsulé, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, elle se trouve généralement dans les milieux aquatiques et le sol (Delmas, 2013). En raison de sa capacité à convertir l'histidine en histamine, elle est étudiée pour son rôle potentiel dans les intoxications alimentaires. Des études montrent que les ions de métaux lourds favorisent la co-sélection des gènes de résistance aux métaux et aux antibiotiques par deux mécanismes principaux : la co-résistance, où des gènes de résistance spécifiques coexistent sur le même élément génétique mobile (plasmide ou transposon), et la résistance croisée, où les bactéries développent simultanément une résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (Xedzro, Shimamoto et al., 2023).



Figure 20: Profil biochimique de l'espèce *Raoultella ornithinolytica*

✚ *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie gram-négative du genre *Pseudomonas*. Ubiquitaire, elle est peu compétitive dans les sols mais montre une certaine attirance pour les milieux hydriques. Elle est très résistante à de nombreux antiseptiques et capable de produire un métabolite secondaire appelé pyocyanine, qui est considéré à la fois comme un pigment et une toxine (Fiche Technique Bactériologie, 2011). Une des caractéristiques de cette bactérie est sa capacité à survivre dans des environnements où le fer est limité, en synthétisant et sécrétant des sidérophores tels que la pyoverdine, qui lorsqu'il est mélangé avec la pyocyanine, lui confèrent un aspect vert brillant caractéristique qui paraît fluorescent (*Bonneau, 2020*).



Figure 21: Profil biochimique de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*

✚ *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Ce sont des bacilles Gram négatif à bouts ronds et encapsulés. Cette espèce se retrouve dans diverses niches écologiques. Elle est capable de produire un biofilm composé de polysaccharides, d'ADN et de protéines, ce qui confère à *K. pneumoniae* une protection contre les molécules antimicrobiennes telles que les antibiotiques et les métaux lourds (*Merciecca, 2022*).



Figure 22: Profil biochimique de l'espèce *klebsiella pneumoniae*

✚ *Citrobacter freundii*

Citrobacter freundii est un bacille à Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae, mobile et aéro-anaérobie. C'est une espèce ubiquitaire et chez l'homme, ils font partie de la flore intestinale (Fiche Technique Bactériologie, 2005). De manière générale, plusieurs études montrent que cette espèce est résistante aux antibiotiques et aux métaux lourds sans préciser les mécanismes spécifiques.



Figure 23 Profil biochimique de l'espèce *citrobacter freundii*

✚ *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae appartient au genre Enterobacter. Ce sont des bacilles à Gram négatif, mobiles et non sporulés. Présents dans l'environnement, ils sont aussi des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Cette espèce a une résistance naturelle et acquise à plusieurs types d'antibiotiques (Clave, 2011). Une étude a révélé que *E. cloacae* contient des gènes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds sur le même plasmide, facilitant ainsi la persistance, la cosélection et la dissémination de ces résistances entre différentes espèces bactériennes (Wu et al, 2018).



Figure 24: Profil biochimique de l'espèce *Enterobacter cloacae*

✚ *Pseudomonas oryzae*

Pseudomonas oryzae est un bacille à Gram négatif du genre *Pseudomonas*, mobile, qui préfère les environnements humides. En raison de la rareté de l'isolement de cette espèce en situation pathogène, il existe peu de données concernant son profil de sensibilité aux antibactériens (Delmas, 2013).



Figure 25: Profil biochimique de l'espèce *Pseudomonas oryzae*

III.3 Effet des métaux sur la croissance des bactéries

Les mesures d'absorbance à 620 nm, résultant de l'exposition bactérienne aux métaux lourds, ont été enregistrés et analysés pour six souches choisies : *Aeromonas Hydrophila* ; *Raoultella ornithinolytica* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *klebsiella pneumoniae* ; *citrobacter freundii* ; *Enterobacter cloacae*. La DO est une mesure de la densité optique, qui est proportionnelle à la concentration bactérienne.

III.3.1 Effet du cadmium

Les résultats présentés dans la figure 26 montrent l'absorbance (DO) à 600 nm des différentes souches à diverses concentrations de cadmium dont ceci représente la croissance bactérienne, dont ils ont été comparés à des témoins sans présence de métal pour chaque souche. Ces témoins permettent d'observer la croissance maximale (A0) à C = 0. Les courbes indiquent une diminution de l'absorbance avec l'augmentation de la concentration en cadmium pour toutes les souches bactériennes, ce qui suggère une inhibition de la croissance bactérienne. C'est à constater que les bactéries présentent un comportement différent vis-à-vis des différentes concentrations.

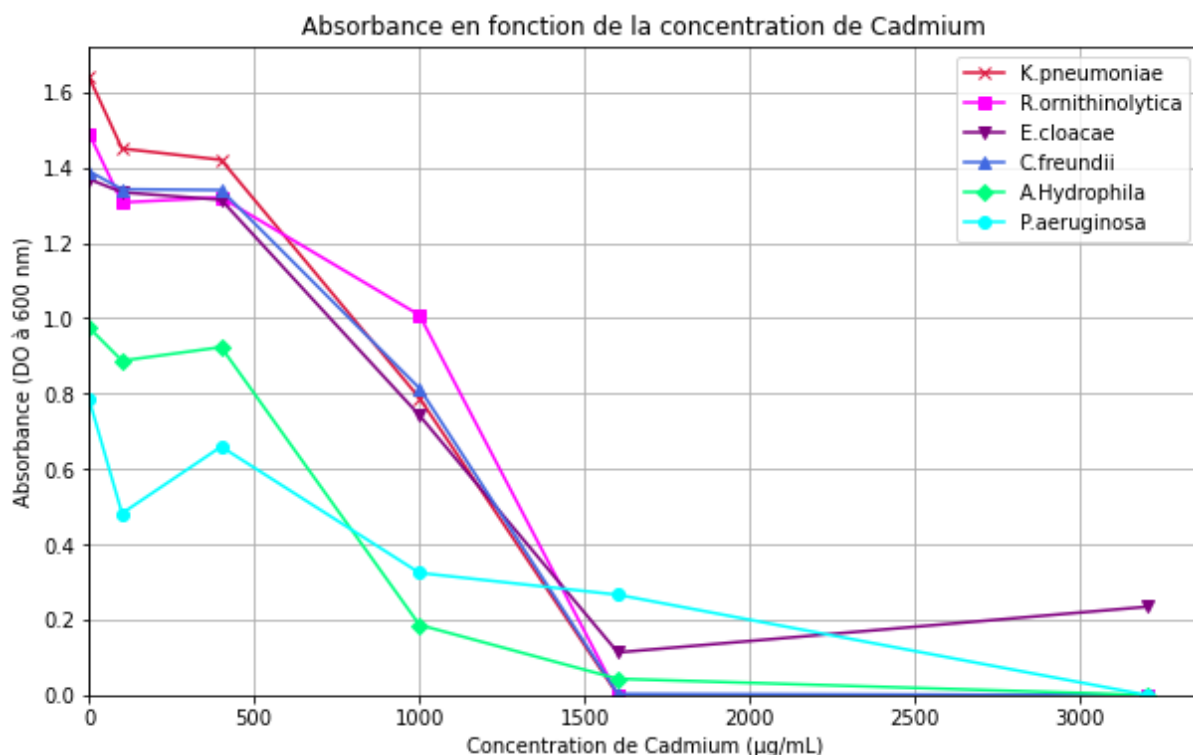


Figure 26: Effet du cadmium sur la croissance des différentes souches bactérienne

Les pourcentages de croissance de chaque souche, calculés à partir de la DO (densité optique) à différentes concentrations de métaux et de la A0 (croissance bactérienne sans présence de métal), ont été utilisés pour tracer l'histogramme de la figure 27. Cet histogramme permet de comparer les taux de croissance des bactéries en fonction des concentrations de cadmium.

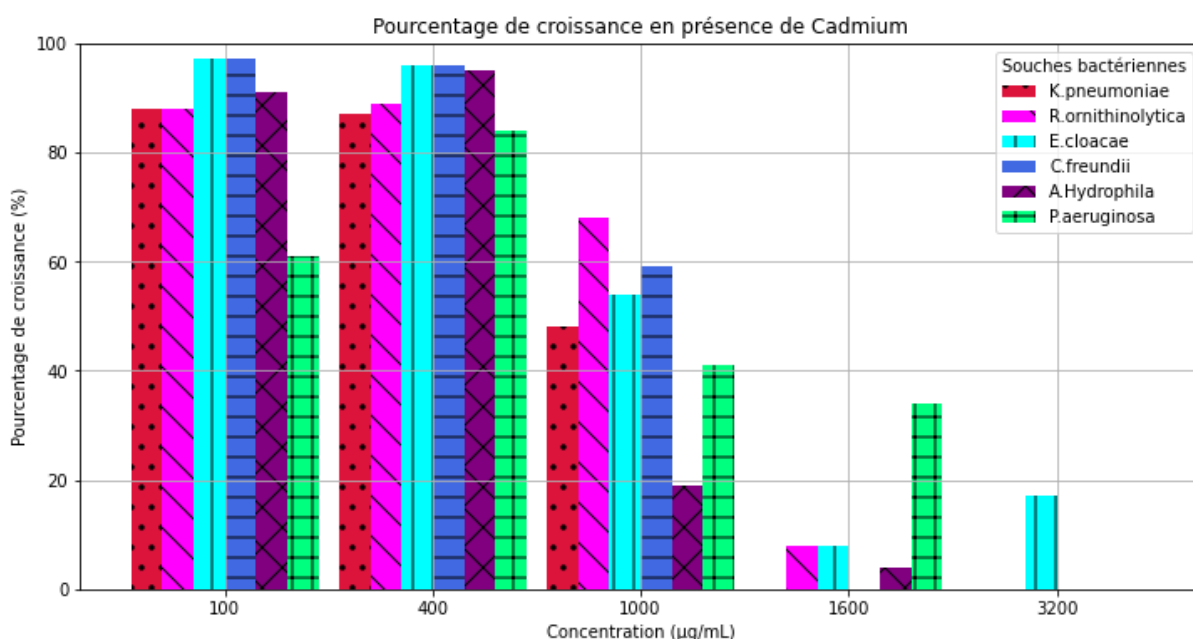


Figure 27 : Distribution du taux de croissance des souches vis-à-vis du cadmium

La croissance diminue de manière significative avec l'augmentation de la concentration de cadmium pour toutes les souches bactériennes. Cependant chez *Enterobacter cloacae*, il y'a augmentation à la concentration 3200 µg/ml.

III.3.2 Effet du cobalt

La figure 28 montre la tendance observée pour le cobalt où l'absorbance diminue avec l'augmentation de la concentration en cobalt ce qui signifie que la croissance des bactéries est fortement inhibée à des concentrations plus élevées du cobalt mais à des rythmes différents selon les souches.

La concentration 1600 µg/ml de cobalt semble être la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui a un effet important sur la croissance de la majorité des souches. La densité la plus importante (DO = 0,26) est enregistrée avec la souche *Raoultella ornithinolytic*, alors que pour les autres souches, celle-ci est égale à 0.

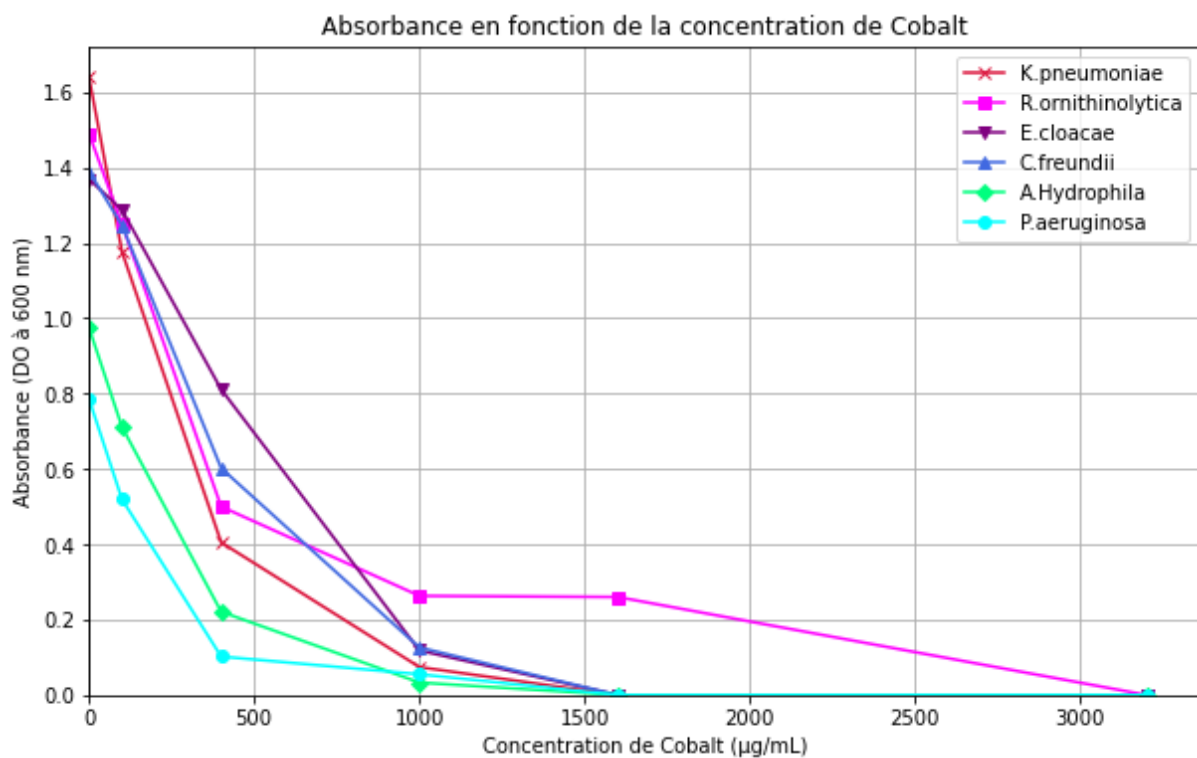


Figure 28 : Effet du cobalt sur la croissance des différentes souches bactériennes

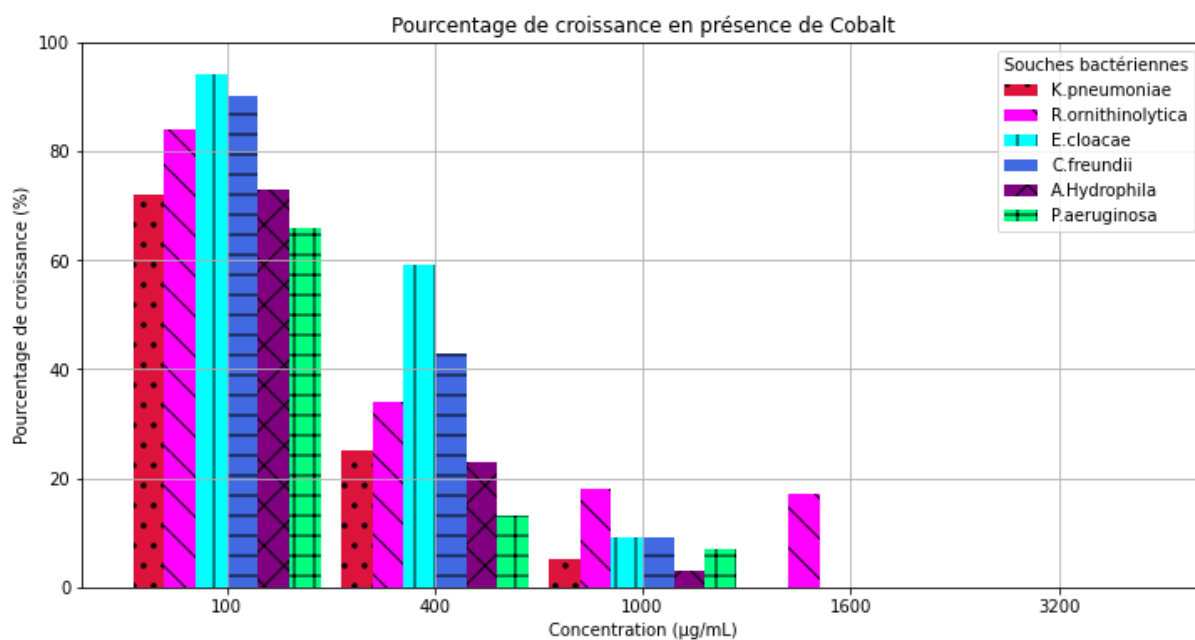


Figure 29: Distribution du taux de croissance des souches vis-à-vis du cobalt

D'après l'histogramme, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* et *Raoultella ornithinolytica* semblent être les souches ayant le taux de croissance le plus élevé par rapport aux autres souches, et ce, même après l'augmentation de la concentration de cobalt.

III.3.3 Effet du cuivre

Les courbes de la fig 30 croissances sous l'effet du cuivre montrent une diminution générale de l'absorbance avec l'augmentation de la concentration. La croissance des bactéries diminue donc également avec l'augmentation des concentrations, bien que certaines souches montrent des différences dans leur résistance au cuivre tel que la *Pseudomonas aeruginosa* qui a pu accroître avec une densité optique allant de 0,818 à 1600 µg/ml après 72H d'incubation. La croissance de cette souche dans presque toutes les concentrations du cuivre testées pourrait s'expliquer par sa résistance vis-à-vis du cuivre. Ensuite celui-ci devient toxique à partir d'une concentration élevée >1500.

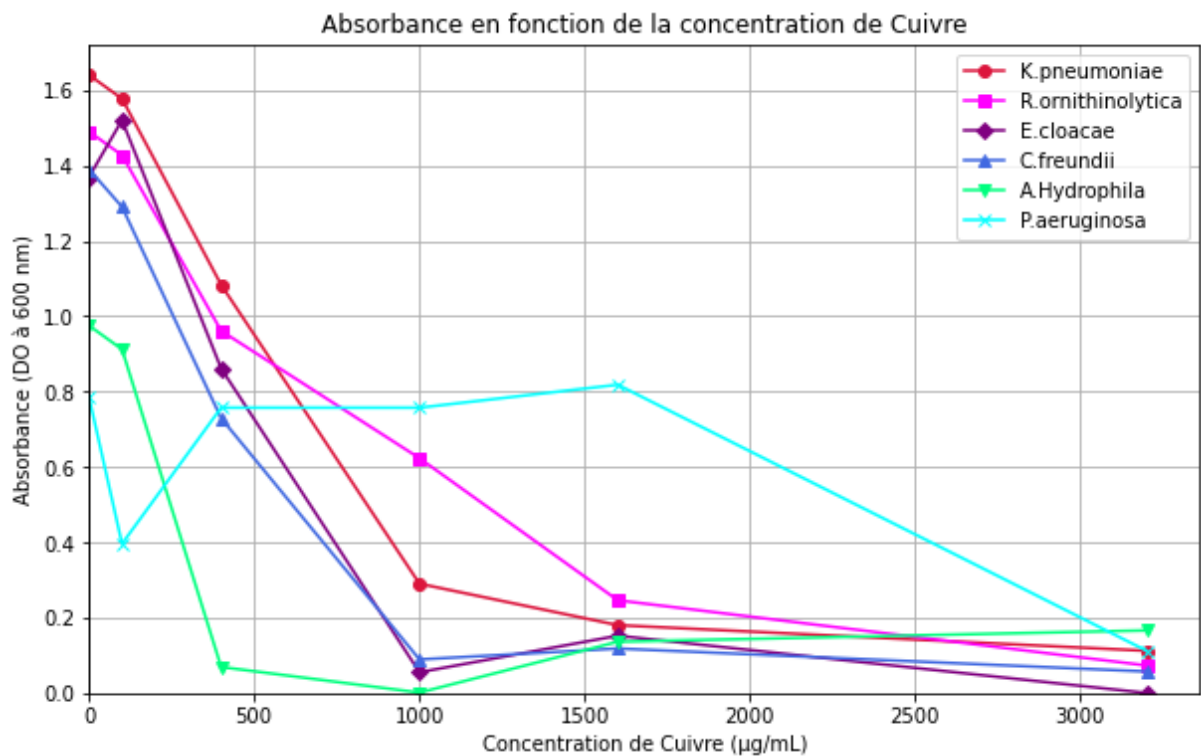


Figure 30: Effet du cuivre sur la croissance des différentes souches bactériennes

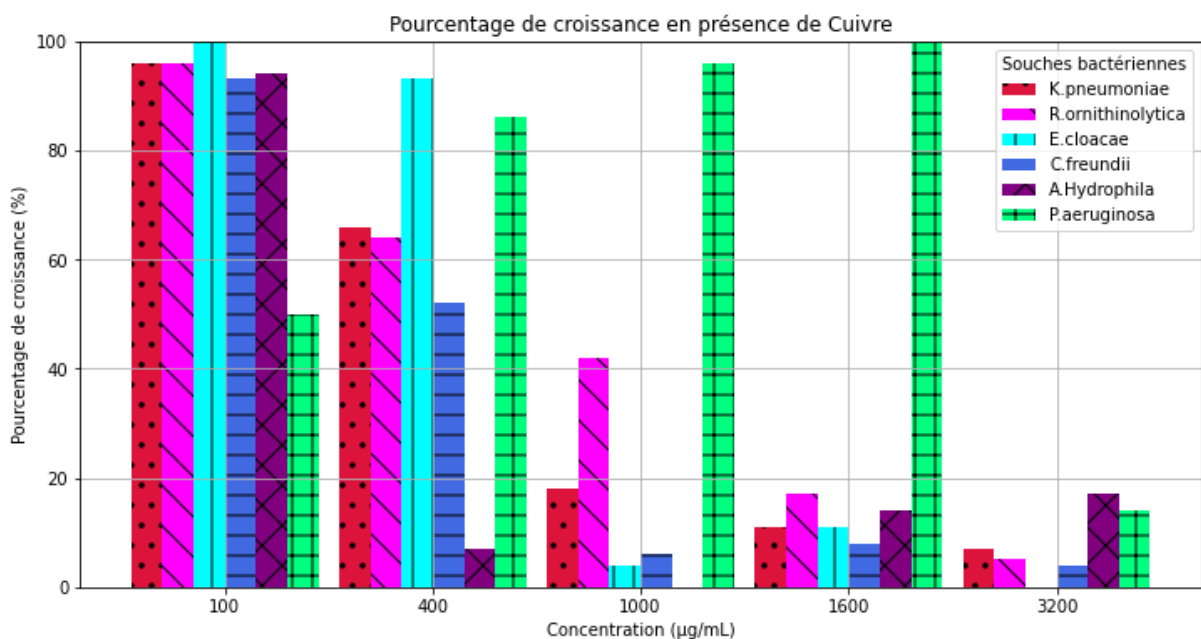


Figure 31: Distribution du taux de croissance des souches vis-à-vis du cuivre

Les résultats montrent que généralement plus la concentration du métal augmente plus la croissance des souches bactériennes étudiées diminue, à l'exception de de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Cette dernière a montré une faible croissance à de faibles concentrations de cuivre, mais une croissance nettement plus élevée a été observée à des concentrations plus fortes.

En effet, l'augmentation de la croissance aux plus fortes concentrations du cuivre chez certaines bactéries a été également soulevé par d'autres auteurs, notamment dans l'étude de Hofmann, Hirsch et al, 2021. On pourra se référer à l'effet de concentration constaté par ces auteurs, où le cuivre pourrait induire une réponse accrue chez *P. aeruginosa* à très fortes concentrations. Par conséquent, il peut entraîner une augmentation des mécanismes de défense supplémentaires chez cette espèce. Une production des protéines est alors déclenchée pour l'aider à résister à ce stress, tels que les protéines de chélatage et des pompes à efflux. Ceci permet d'expulser le cuivre excédentaire facilitant ainsi une croissance plus élevée que dans des conditions de concentration faible où les mécanismes de défense sont moins activés.

III.3.4 Comparaison de la réactivité de chaque espèce bactérienne aux métaux

Toutes les bactéries montrent des tolérances décroissantes en augmentant les concentrations des trois métaux lourds (cadmium, cobalt, cuivre), et les concentrations entre 1600 µg/ml et 3200 µg/ml sont généralement suffisantes pour inhiber la croissance bactérienne de manière significative. Toutefois chaque espèce présente une réaction différente vis-à-vis à chaque métal.

III.3.4.1 *klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae présente une résistance au cuivre jusqu'à 3200µg/ml, au cadmium à 1000 µg/ml, mais montre une sensibilité accrue au cobalt.

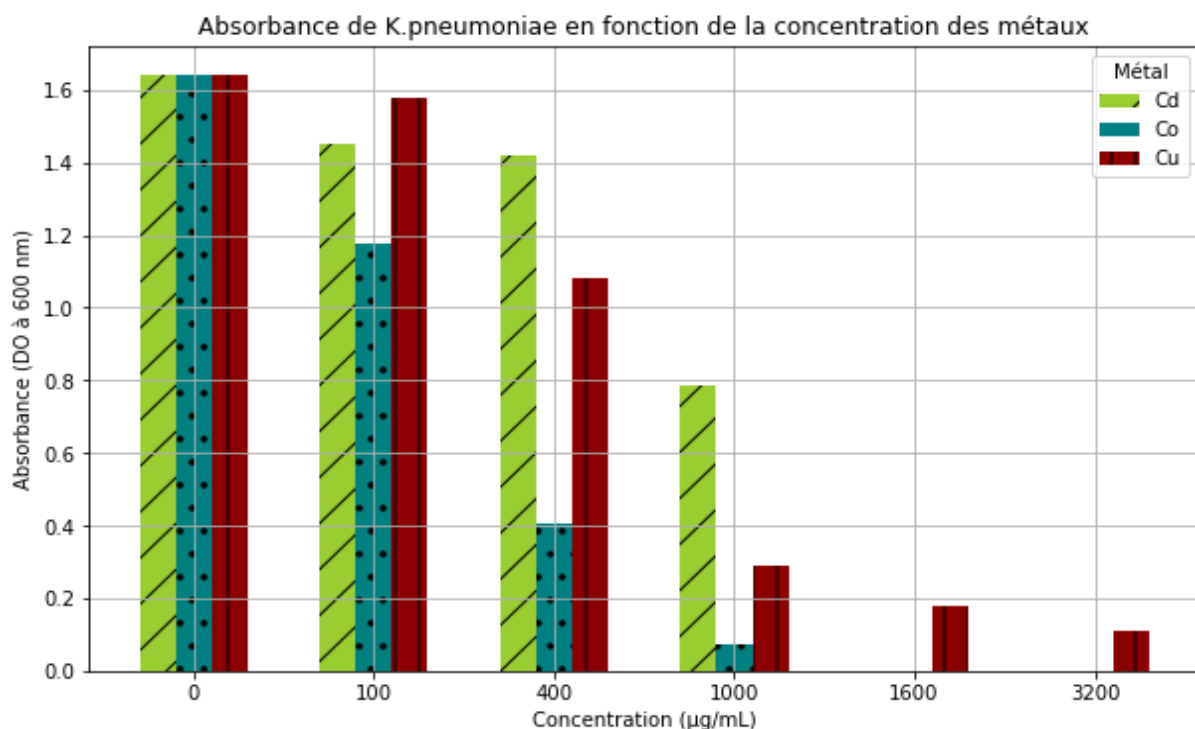


Figure 32: Absorbance de *klebsiella pneumoniae*

III. 3. 4. 2 *Raoultella ornithinolytica*

Raoultella ornithinolytica est moins sensible au cobalt et au cuivre qu'au cadmium à des concentrations supérieures à 1000 µg/ml. Cependant, à des concentrations inférieures à 1000 µg/ml, *Raoultella* montre une plus grande tolérance au cadmium.

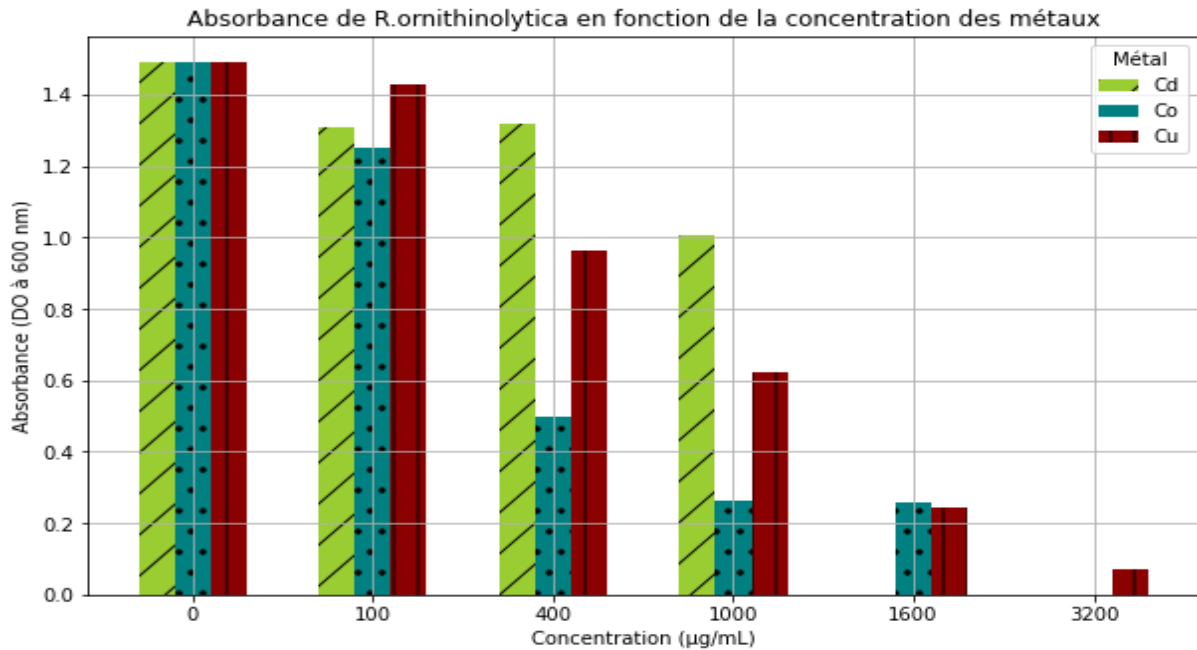


Figure 33: Absorbance de *Raoultella ornithinolytica*

III. 3. 4.3 *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae présente une tolérance plus grande au cadmium qu'au cobalt et au cuivre à des concentrations égales et supérieures à 400 µg/ml.

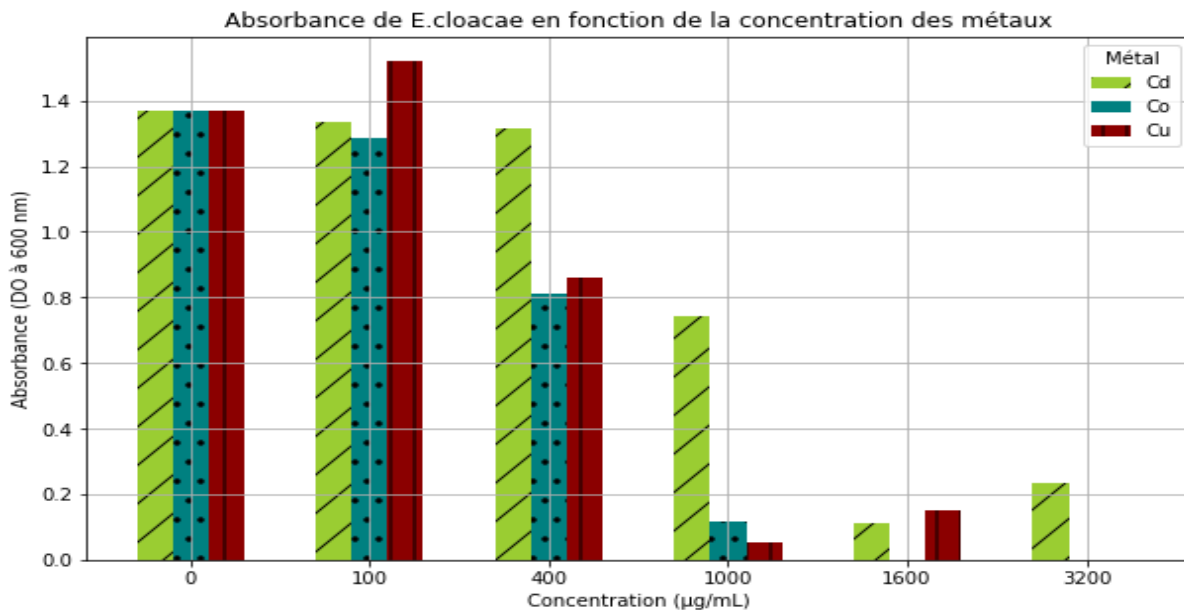


Figure 34: Absorbance de *Enterobacter cloacae*

III. 3. 4.4 *Citrobacter Freundii*

Le cuivre semble être la moins toxique pour cette souche à des concentrations élevées comparé au cobalt et au cadmium.

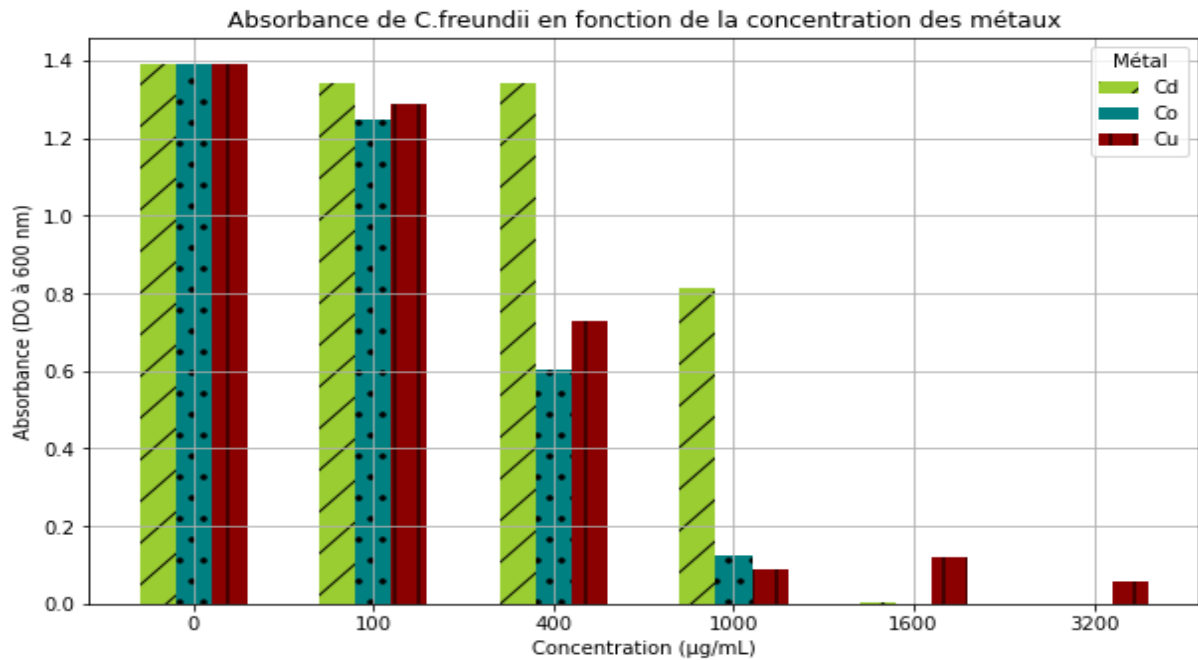


Figure 35 : Absorbance de *Citrobacter Freundii*

III.3.4.5 *Aeromonas Hydrophila*

Aeromonas hydrophila est la souche la plus sensible parmi celles testées, comme le montre la figure. On observe une chute drastique de sa croissance à partir de 400 µg/ml pour le cobalt et le cuivre, et à 1000 µg/ml pour le cadmium.

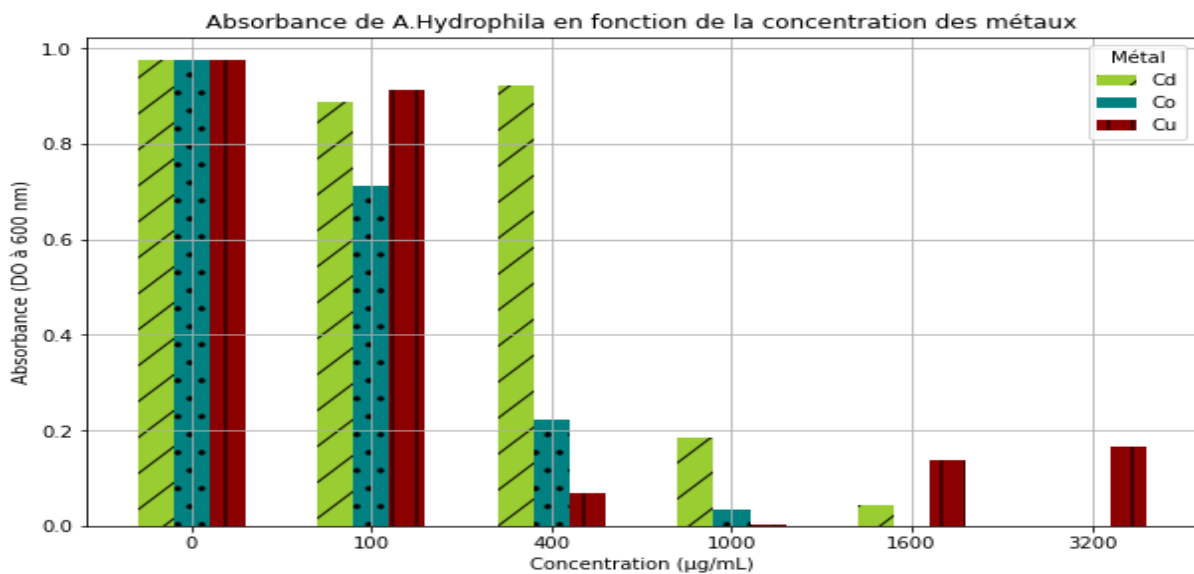


Figure 36: Absorbance de *Aeromonas Hydrophila*

III. 3. 4.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa présente une très forte tolérance au cuivre à des concentrations très élevées, se révélant être la plus tolérante de toutes les souches testées. En revanche, elle est la moins tolérante au cobalt.

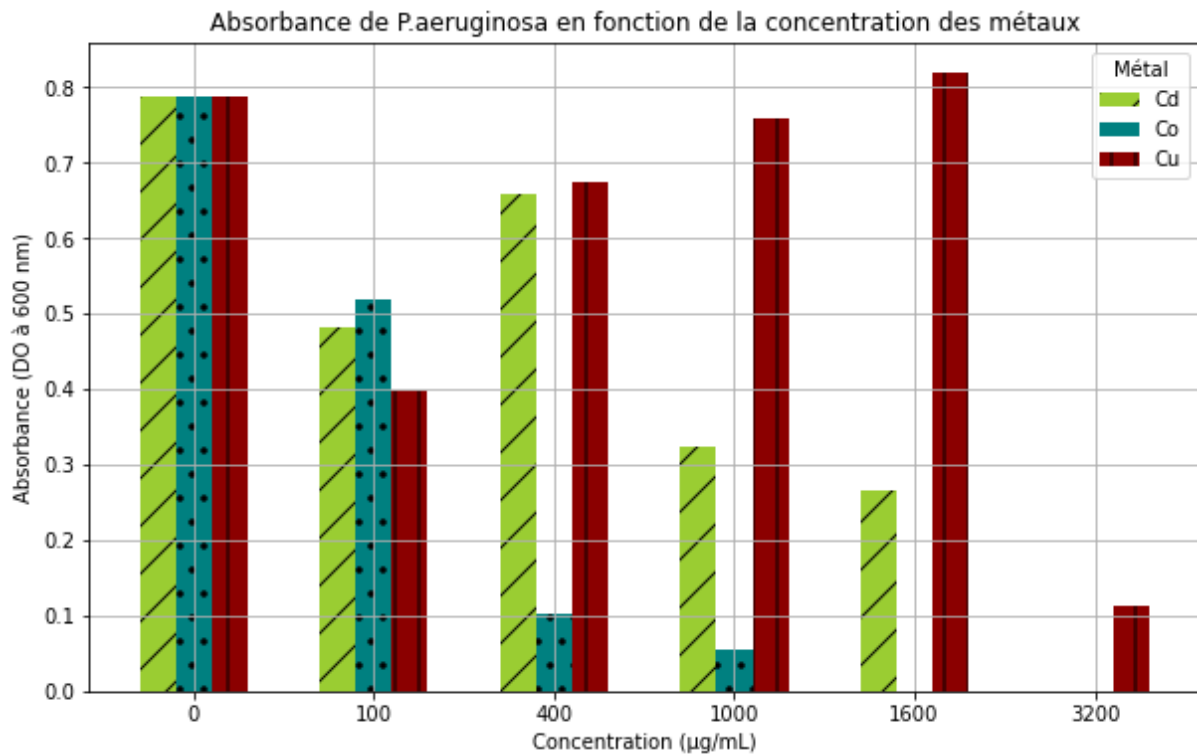


Figure 37: Absorbance de *Pseudomonas aeruginosa*

Discussion sur la réactivité bactérienne aux métaux

Les résultats obtenus montrent que chaque métal a un effet variable sur la croissance des différentes bactéries testées et cela à différentes concentrations. En effet, certains métaux comme le fer, le zinc, le manganèse, le molybdène, le cobalt et le vanadium sont essentiels pour les bactéries car ils agissent comme des micronutriments. Cependant, à des concentrations élevées, ces métaux peuvent devenir toxiques.

Selon Nriagu et al, 2015, les métaux pénètrent souvent dans les cellules bactériennes via des pompes spécifiques conçues pour transporter ces éléments essentiels. Une fois à l'intérieur des cellules après les avoir absorbés, les bactéries ont développé des mécanismes pour transporter et livrer les ions métalliques aux endroits appropriés dans les cellules. Les ions métalliques peuvent être séquestrés et stocker dans les cellules ou expulsés pour maintenir une concentration appropriée.

Le cuivre est à la fois essentiel et toxique pour de nombreux micro-organismes. Généralement, les protéines contenant du cuivre sont situées à l'extérieur du cytoplasme. Dix types d'enzymes dépendantes du cuivre ont été identifiées chez les

procaryotes, dont le cytochrome c oxydase qui est présent dans la plupart des organismes (Lout et al. 2015)

La résistance au cadmium chez les bactéries se fait par trois mécanismes principaux (i) une pompe à membrane unique appelée CZCD qui expulse les ions cadmium du cytoplasme ; (ii) un système d'efflux CBA codé par le déterminant CZCD qui peut expulser les ions métalliques du cytoplasme et du périplasme en conférant aussi une résistance au cobalt et au zinc ; (iii) une ATPase appelée CadA qui aide également à résister au cadmium.

Selon Rozycki et Nies.(2008), dans certains cas, certaines bactéries se développent de manière optimale à des concentrations élevées de certains métaux. Les bactéries régulent l'homéostasie des métaux dans leurs cellules en particulier les bactéries à Gram négatif, et avec ces mécanismes de systèmes d'efflux spécialisés certaines de ces bactéries se développent mieux à des concentrations élevées en métaux lourds, nécessitant une consommation accrue d'énergie et de ressources.

En résumé, certaines bactéries peuvent non seulement survivre mais aussi prospérer en présence de concentrations élevées de métaux grâce à des mécanismes d'efflux efficaces qui régulent l'homéostasie des métaux. Ce qui peut expliquer les variabilités dans les résultats précédents.

III.4 Perspectives du développement de biocapteur bactérien pour la détection des métaux

Les résultats obtenus précédemment suggèrent la possibilité de développer un biocapteur bactérien utilisant un transducteur optique basé sur la mesure de la turbidité pour surveiller les métaux lourds dans l'eau. Cependant, ce concept présente plusieurs défis techniques majeurs.

La turbidité, qui mesure la densité des particules en suspension dans un milieu aquatique manque de spécificité. En effet, divers facteurs peuvent influencer la croissance bactérienne et, par conséquent, la turbidité, ce qui complique l'interprétation des résultats. De plus, la sensibilité de cette méthode pourrait être insuffisante pour détecter des concentrations faibles de métaux lourds, limitant ainsi son efficacité en tant qu'outil de détection précis.

Pour améliorer la spécificité et la sensibilité du biocapteur, il serait pertinent de viser un transducteur qui détecte la bioluminescence, la fluorescence, ou encore des capteurs électrochimiques. Ces méthodes offrent des avantages significatifs en termes de spécificité et de sensibilité, notamment lorsqu'elles sont couplées à des bactéries génétiquement modifiées. En effet, la modification génétique permettrait d'utiliser la

bioluminescence ou la fluorescence comme indicateurs spécifiques de la présence de métaux lourds, rendant ainsi la détection plus fiable.

En résumé, le travail présenté dans cette étude constitue une recherche fondamentale visant à concevoir un biocapteur bactérien. Toutefois, les résultats obtenus soulignent la nécessité d'approfondir cette recherche par des études plus spécifiques et des expérimentations supplémentaires, nécessitant des moyens techniques et financiers plus importants pour être menées à bien. Ces travaux futurs seront essentiels pour aboutir à un dispositif de détection opérationnel et efficace.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats de l'étude de l'effet du cadmium, cobalt et cuivre sur la croissance de certaines souches bactériennes provenant des eaux de trois zones d'étude : Boumaâti, Oued El Harrach et Oued Baba Ali permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Chaque espèce bactérienne présente un comportement différent vis-à-vis des différentes concentrations qui se caractérise généralement par une densité donnée ;
- Toutes les souches bactériennes se développent dans les concentrations allant de 100 à 1000 µg/ml de métal ;
- Pour des concentrations supérieures à 1000 µg/ml, seules quelques souches bactériennes sont capables de survivre. Certaines souches peuvent tolérer ces concentrations élevées pour les trois métaux étudiés, tandis que d'autres ne le peuvent que pour un seul métal spécifique ;
- Certaines espèces bactériennes présentent des pics de croissance à certaines après des durées d'incubation longues et des concentrations élevées en métal comparé à la concentration faible ;
- Des recherches plus approfondies et des études supplémentaires seraient nécessaires pour développer des biocapteurs bactériens de manière efficace. En perspective, il serait important de :
 - Tester l'effet d'autres métaux lourds mais aussi d'autres espèces et souches bactériennes.
 - Prendre en compte l'influence d'autres paramètres physico-chimiques et opérationnels tels que : le pH, l'oxygène dissous, l'agitation et le temps d'incubation.
 - Doser la Méthionine pour mieux comprendre l'effet des métaux sur les bactéries.
 - Utiliser et tester des souches de référence connue pour être résistante aux métaux.
 - Utiliser des méthodes génétiques pour déterminer des gènes de régulation de l'homéostasie et les gènes de résistances contre des agents chimiques testés.
 - Étudier l'impact des métaux sur les bactéries dans leur habitat naturel (in situ), plutôt que dans des conditions de laboratoire, afin de comprendre comment pourrait-on réaliser un biocapteur.

Références bibliographiques

1. **Abdulla, M., & Chmielnicka, J. (1990)**. New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure to toxic metals. **Biological Trace Element Research**, 23, p.p 25–53.
2. **Aroussi, R., & Nabgha, K. (2020)**. Etude de faisabilité d'un micro biocapteur hyperfréquences. [en ligne] [consulté le 13 août. 2024] disponible sur le Web : <https://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/handle/123456789/28222>.
3. **Ayouni-Derouiche, L., Barbier-Bessueille, F et al, (2021)**. Analyse de traces et d'ultra-traces d'éléments. **Les Techniques de l'Ingénieur**, P3860 V4.
4. **Barbier, O., Jacquillet, G et al (2005)**. Nephron physiology: Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. **Nephron Physiology**, 99(3), p.p 105–110.
5. **Benaissa, A. (2020)**. Techniques d'Analyse Microbiologique.
6. **Benaissa, A. (2022)**. Cours Microbiologie Appliquée et Environnementale.
7. **Billard, P., & DuBow, M. S. (1998)**. Bioluminescence-based assays for detection and characterization of bacteria and chemicals in clinical laboratories. **Clinical Biochemistry**, 31(1), p.p 1-14.
8. **Blum, W. E. (1990)**. The challenge of soil protection in Europe. **Environmental Conservation**, 17(1), p.p 72-74.
9. **Bonneau, A. (2020)**. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'import du fer par la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. **Bactériologie**. France : Université de Strasbourg. (NNT : 2020STRAJ028). (tel-03504318).
10. **Bourg, A. C. M. (1983)**. Modélisation du comportement des métaux traces à l'interface solide - liquide dans les systèmes aquatiques (Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1).
11. **Briscoe, S. F., Cai, J., & DuBow, M. S. (1996)**. Luminescent bacterial biosensors for the rapid detection of toxicants. In **Microscale aquatic toxicology - advances, techniques and practice**.
12. **Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000)**. Microbial resistance to heavy metals in the environment. **Ecotoxicity and Environmental Safety**, 45, p.p 198-207.
13. **Bury-Moné, S. (2007)**. Les biofilms. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p.
14. **Bury-Moné, S. (2007)** Nutrition et croissance des micro-organismes.
15. **Cervantes, C., Chávez, J et al (1986)**. Resistance to metal by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Microbios Letters**, 33, p.p 65-71.
16. **Cervantes, C., & Gutierrez-Corona, F. (1994)**. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, 14, p.p 121-138.

17. **Chen, S., Wilson, D. et al (1998).** Concentrations of cadmium, copper, and zinc in animal manure and implications for land application. **Journal of Environmental Quality**, 27(2), p.p 1191-1198.
18. **Cooksey, D. A. (1994).** Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 14, p.p 381-386.
19. **Cousin, S. F., & Gaspard, F. (2006).** Les biosurfactants: Une alternative aux tensioactifs chimiques. **Industries Alimentaires et Agricoles**, 123(7-8), p.p 59-64.
20. **Cox, C. D. (1989).** The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological Reviews**, 53(3), p.p 229-239.
21. **Desaunay, A. (2011).** Étude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange par **Escherichia coli** et **Cupriavidus metallidurans** en colonnes de sable d'Hostun. **Sciences de la Terre**. France : Université de Grenoble.
22. **Delmas, C. (2005).** Fiche technique _ Bactériologie 54 EN.FTBAC. 29-09-11.01. Laboratoire de Bactériologie, CHU Toulouse Purpan. Émis le 23 novembre, p. 2/2.
23. **Delmas, C. (2013).** Fiche technique bactériologie _ **Raoultella ornithinolytica**. Laboratoire de Bactériologie Hygiène, France : Toulouse - Institut Fédératif de Biologie.
24. **Deneux-Mustin, S., Rouiller, J et al (1994).** Détermination de la capacité de fixation des métaux par les biomasses microbiennes des sols, des eaux et des sédiments : intérêt de la méthode du titrage potentiométrique. **C.R. Acad. Sci.**, 319, p.p 1057-1062.
25. **Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S et al (2003).** Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces: influence des micro-organismes du sol. **Tec & Doc - Lavoisier**, France: Paris.
26. **Department of Health Statistics and Informatics of the Innovation. (2011).** **World Health Statistics 2011**. Geneva: World Health Organization.
27. **El Alami El Hassani, N. (2019).** Conception et réalisation de capteurs et de biocapteurs électrochimiques à base de nanomatériaux pour le contrôle de la qualité en agroalimentaire et pour l'analyse biomédicale [Ph.D. thesis]. France : Université de Lyon.
28. **EUCAST. (2021).** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2021 (V.1.0 Avril).
29. **Fallon, L. M. D. Jr. (2006).** Infancy through adolescence: Heavy metal poisoning. **Gale Encyclopedia of Children's Health**, 4, p.p 866-868.
30. **Forstner, U., & Salomons, W. (1991).** Mobilisation of metals from sediments. In E. Merian (Ed.), **Metals and their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance** Allemagne : Weinheim. p.p 379-398
31. **Fiche technique _ Bactériologie (Edition 2011)** 113 EN.FTBAC. 14-10-11.01 Emis le 03 août 2011 Page 1 sur 5 Danielle CLAVE

32. **Georges Asch. (1993).** *Les Capteurs en instrumentation industrielle* (4th ed.). Dunod.
33. **Gilbin, R. (2013).** Biodisponibilité des éléments traces métalliques et des radionucléides en milieu aquatique continental. Implications pour l'évaluation du risque écologique dans un contexte de multi-contamination (Doctoral dissertation, Université Montpellier 1).
34. **Guiraud, J. P. (1998).** *Microbiologie alimentaire: Rappels de microbiologie générale* (2nd ed.). Dunod.
35. **Hebert, S., & Legre, S. (2000).** Suivi de la qualité de l'eau des rivières et petits cours d'eau. Direction du suivi de l'état de l'environnement, Ministère de l'Environnement Gouvernement du Québec.
36. **Hidri, N., & Ploy, M.-C. (2011).** Bactériologie Médicale : Chapitre 42 Instauration et surveillance d'un traitement antibiotique.
37. **International Conference on Soil Quality. (1997).** *Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces: Influence des micro-organismes du sol*. Tec & Doc, France : Lavoisier, Paris.
38. **Jouanneau, S., & Thouand, G. (2019).** *Biocapteurs pour la surveillance des polluants dans l'environnement*. Editions TI.
39. **Kaur, G., Raina, J. (2024).** Progrès récents dans les aptamères à base de nanomatériaux comme biocapteurs pour la détection au point de service des ions Hg²⁺ et ses applications environnementales. *Talanta*, 277, 126372.
40. **La Colla, N. S., Domini, C. E et al (2015).** Approches les plus récentes sur les méthodes de préconcentration par chimie verte pour la détermination des traces de métaux dans l'eau de mer – une revue. *Journal of Environmental Management*, 151, p.p 44-55.
41. **Lacoue-Labarthe, T. (2007).** Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune *Sepia officinalis* et effets potentiels sur les fonctions digestives et immunitaires. *Physiologie* [q-bio.TO]. France : Université de La Rochelle.
42. **UPBM (2013).** Spectrophotométrie des suspensions bactériennes. Consulté en ligne, le 09/2024. <https://www.upbm.org/site-association/vie-associative/cela-fait-debat/spectrophotometrie-des-suspensions-bacteriennes>
43. **Le Conseil canadien des ministres de l'environnement. (2011)** *Manuel des protocoles d'échantillonnage pour l'analyse de la qualité de l'eau au Canada*. Ottawa : Le Conseil canadien des ministres de l'environnement.
44. **Le Goff, F., & Bonnomet, V. (2004).** Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM (Rapport technique INERIS DRC-03-46822-FLg/JL-03.0693). INERIS.
45. **Leveau, J.-Y., Larpent, J.-P et al (2001).** Contamination des produits naturels et des chaînes de fabrication : Sécurité microbiologique des procédés alimentaires (F1120 v1).

46. **Leveau, J.-Y., Larpent, J.-P., et al (2001).** Inhibition de la croissance microbienne. *Sécurité microbiologique des procédés alimentaires*. ARTICLE DE RÉFÉRENCE | Réf : F1120 v1, 10 mars.
47. **Marchal, N., Bourdon, J. L et al (1991).** *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries* (3rd ed.).
48. **Maurice, M. (1996).** *L'écotoxicologie appliquée au milieu marin*. Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral, R.INT.DEU96. 11/NANTES.
49. **McBride, M. B. (2000).** Chemisorption and precipitation reactions. In M. E. Summer (Ed.), *Handbook of soil science* (p.p B265-B303). CRC Press LLC, Boca Raton.
50. **Ministère de l'Environnement japonais, Division de la sécurité environnementale, Département de santé environnementale, Ministère de l'Environnement. (2013).** *Leçons tirées de la maladie de Minamata et traitement du mercure au Japon*.
51. **Nriagu, J. O., & Pacyna, J. M. (1988).** Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333(6169), p.p 134-139.
52. **Ouellet, A. (1995).** *Les Métaux lourds en milieu aquatique*. Éditions Technique et Documentation.
53. **Pacyna, J. M., & Nriagu, J. O. (1988).** Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333(6169), p.p 134-139.
54. **Ploy, M.-C., & Hidri, N. (2011).** *Bactériologie Médicale : Chapitre 42 Instauration et surveillance d'un traitement antibiotique*.
55. **Pourcel, F., & Gosselin, C. (2021).** *Microbiologie et contamination des produits alimentaires*. Springer.
56. **Quevauviller, P. (2002).** *Matériaux de référence pour l'environnement*. Éditions Tec & Doc.
57. **Raina, J., Kaur, G., et al (2024).** Progrès récents dans les aptamères à base de nanomatériaux comme biocapteurs pour la détection au point de service des ions Hg^{2+} et ses applications environnementales. *Talanta*, 277, 126372.
58. **Ramade, F. (1992).** *Précis d'écotoxicologie*. Paris: Masson. ISBN 978-2-225-82578-1
59. **Ramamoorthy, S., Springthorpe, S et al (1977).** Competition for mercury between river sediment and bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 17, p.p 505-511.
60. **Royet, K. (2018).** *La réponse au stress chez les bactéries : réponse au stress métallique chez Pseudomonas putida et au stress rencontré en cours d'infection de plante chez le phytopathogène Dickeya dadantii*. France : Université de Lyon. [Doctoral dissertation].
61. **Saidi, N., Lagha, R., et al (2013).** Production de mucus, résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques chez *Aeromonas hydrophila* isolé en Tunisie. *African Journal of Microbiology Research*, 7(11), p.p 955-965.

62. **Saidi, N., Lagha, R., et al (2013).** Slime producing, heavy metals and antibiotics resistance in *Aeromonas hydrophila* isolated in Tunisia.
63. **Hu, S. Y., Hui, C. Y et al (2024).** Dual-colored bacterial biosensor responsive to cadmium, mercury, and lead for detecting heavy metal pollution in seawater. *Ecological Indicators*, 166, 112244.
64. **Silver, S. (1998).** Genes for all metals - a bacterial view of the periodic table. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 1-12.
65. **Silver, S., Misra, T. K. (1988).** Plasmid mediated heavy metal resistances. *Annual Review of Microbiology*, 42, 717-743.
66. **Silver, S., & Phung, L. T. (1996).** Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Review of Microbiology*, 50, p.p 753-789.
67. **Simpson, M. L., Sayler, G. S et al (1998).** Bioluminescent-bioreporter integrated circuits form novel whole-cell biosensors. *Trends in Biotechnology*, 16, p.p 332-338.
68. **Technologies Agilent. (2021)** Éléments fondamentaux de la spectrophotométrie UV-Vis : Guide.
69. **Touaitia, Dr. (2024).** *Microbiologie générale*. ResearchGate. En ligne. Consulté aout 2024 disponible sur le web : https://www.researchgate.net/publication/339461316_microbiologie_generale_Dr_TOUAITIA
70. **Traveset, A., & Richardson, M. (2019).** Ecological and evolutionary consequences of interactions between plants and their pollinators. In *Plant-pollinator interactions* (p.p 27-45). Springer.
71. **Turrens, J. F., & Boveris, A. (1980).** Generation of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(16), p.p 7545-7551.
72. **Uchida, S., & Wang, Z. (2015).** Approche les plus récentes sur les méthodes de préconcentration par chimie verte pour la détermination des traces de métaux dans l'eau de mer – une revue. *Journal of Environmental Management*, 151, p.p 44-55.
73. **University of Illinois at Urbana-Champaign. (2021).** *Handbook of Soil Science* (2nd ed.). CRC Press.
74. **Uchida, S., Wang, Z., et al (2015).** Approches les plus récentes sur les méthodes de préconcentration par chimie verte pour la détermination des traces de métaux dans l'eau de mer – une revue. *Journal of Environmental Management*, 151, p.p 44-55.
75. **Vijay, U., Gupta, S et al (2018).** *Microbial mutagenicity assay: Ames test*. *Bio-protocol*, 8(6), e2763-e2763.
76. **Valls, M., & de Lorenzo, V. (2002).** Exploiting the natural variation of bacteria for the development of bioremediation strategies. *Nature Biotechnology*, 20(6), p.p 607-612.
77. **Wang, Z., & Uchida, S. (2015).** Approches les plus récentes sur les méthodes de préconcentration par chimie verte pour la détermination des traces de métaux

- dans l'eau de mer – une revue. **Journal of Environmental Management**, 151, p.p 44-55.
78. **Wu, C., Lin, C (2018).** **The β -Lactamase Gene Profile and a Plasmid-Carrying Multiple Heavy Metal Resistance Genes of Enterobacter cloacae**.
 79. **Wu, W., Feng, Y et al (2019).** **Characterization of a strain representing a new Enterobacter species, Enterobacter chengduensis sp. nov.** Antonie Van Leeuwenhoek, 112, p.p 491-500.
 80. Xedzro, C., Shimamoto, T., Yu, L., Zuo, H., Sugawara, Y., Sugai, M., & Shimamoto, T. (2023). **Emergence of colistin-resistant Enterobacter cloacae and Raoultella ornithinolytica carrying the phosphoethanolamine transferase gene, mcr-9, derived from vegetables in Japan**. [Journal name and publication specifics are missing from the original list.]
 81. **Yuan, X., Zhang, Y et al (2019).** *Characterization of heavy metal-resistant bacteria from contaminated environments and their potential use in bioremediation**. **Environmental Science and Pollution Research**, 26, p.p 23000-23010.
 82. **Zawisza, M., & Kubiak, K. (2020).** *The Effectiveness of Biosorption for Heavy Metal Removal from Contaminated Water. Environmental Science & Technology*, 54(5), p.p 2896-2903
 83. **Zhu, X., Liang, X et al (2020).** *Development of a novel biosensor for rapid detection of heavy metals in aquatic environments**. **Journal of Hazardous Materials**, 385, 121533.
 84. **Zolfaghari, S., & Tavakoli, H. (2017).** *Comparative study on biosorption of heavy metals by different types of microbial biomass. Journal of Environmental Management*, 199, p.p 48-56.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Composition chimique des milieux de culture déshydratés

- **TERGITOL 7 (GELOSE LACTOSEE)**

Le tergitol est un milieu sélectif, différentiel, pour la recherche et la numération des coliformes dans les aliments et les eaux et inhibe les germes Gram +.

Composition en g/L :

Peptone de viande : 10,0

Extrait de levure : 6,0

Extrait de viande : 5,0

Lactose : 20,0

Bleu de bromothymol : 0,05

Tergitol 7 : 0,1

Agar agar : 12,7

pH final $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C et autoclaver 15 minutes à 115 °C

- **TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose)**

Le TCBS est un milieu d'isolement sélectif utilisé pour la recherche des *Vibrio*.

Composition en g/L :

- Polypeptone : 10,0

- Extrait autolytique de levure : 5,0 g

- Saccharose : 20,0 g

- Bile de bœuf bactériologique : 5,0 g

- Cholate de sodium : 3,0 g

- Citrate de sodium : 10,0 g

- Thiosulfate de sodium : 10,0 g

- Chlorure de sodium : 10,0 g

- Citrate ferrique ammoniacal : 1,0 g

- Bleu de bromothymol : 40,0 mg

- Bleu de thymol : 40,0 mg

- Agar agar bactériologique : 14,0 g

pH finale $8,6 \pm 0,2$ à 25°C à ne pas autoclaver

- **Chapman**

Le milieu de Chapman est utilisé pour l'isolement des Staphylocoques pathogènes qui donnent des colonies jaunes par fermentation du mannitol et virage du rouge de phénol.

Composition en g/L :

Peptone de caséine 5,00

Peptone de viande 5,00
Extrait de viande 1,00
D-mannitol 10,00
Chlorure de sodium 75,00
Rouge de phénol 0,025
Agar 15,00
Autoclaver à 115°C pendant 15 minutes.

- **cétrimide**

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et l'identification présomptive de *Pseudomonas aeruginosa*.

Composition en g/L :

Peptone 20,00
Chlorure de magnésium 1,40
Sulfate dipotassique 10,00
Cetrimide (cetyltrimethylammonium bromide) 0,30
Glycérol 10 ml
Agar 13,60
pH final à 25°C : $7,2 \pm 0$, autoclaver à 115°C pendant 15 minutes.

- **sabouraud**

La gélose Sabouraud est un milieu d'utilisation générale, permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de levures et moisissures.

Composition en g/L :

Peptone de caséine 5,00
Peptone de viande 5,00
Glucose monohydraté 40,00
Chloramphénicol 0,50
Agar 15,00
pH final à 25°C : $5,6 \pm 0,2$
Autoclaver à 115°C pendant 15 minutes.

- **Le bouillon de Mueller Hinton**

Le bouillon de Mueller Hinton est utilisé comme milieu non sélectif pour la culture de très nombreux microorganismes de diverses origines, ainsi que pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices par la méthode en dilutions.

Composition en g/L :

Hydrolysate acide de caséine : 17,5 g

Infusion de viande : 2,0 g

Amidon : 1,5 g

pH final 25 °C : 7,4 ± 0,2, autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes.

API 20 E :

Est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, celui-ci comprend une bande en plastique contenant 20 mini-puits de test. Chaque puits contient des milieux déshydratés avec des compositions chimiquement définies pour détecter généralement l'activité enzymatique. Les différents tests contenus dans les puits sont :

ONPG : test de l'enzyme β -galactosidase par hydrolyse du substrat o-nitrophényl-bD-galactopyranoside, ce qui provoque un changement de couleur du milieu (jaune) indiquant une réaction positive. Ce test est particulièrement utile pour identifier les bactéries capables de fermenter le lactose

ADH: décarboxylation de l'acide aminé arginine par l'arginine dihydrolase ce qui augmente le pH du milieu, provoquant un changement de couleur indicatif (par exemple, du jaune à l'orange/rouge).

LDC: décarboxylations de l'acide aminé lysine par la lysine décarboxylase, Comme pour l'ADH, la décarboxylation entraîne une augmentation du pH, visible par un changement de couleur dans le milieu.

ODC: décarboxylations de l'acide aminé ornithine par l'ornithine décarboxylase avec un changement de couleur indicatif dû à l'alcalinisation du milieu.

CIT: utilisation du citrate comme seule source de carbone, Les bactéries capables de métaboliser le citrate provoqueront une alcalinisation du milieu, souvent révélée par un indicateur de pH qui change de couleur (par exemple, de vert à bleu dans le milieu de Simmons).

H₂S: ☑ Détecte la production de sulfure d'hydrogène (H₂S) par des bactéries à partir de composés soufrés. L'H₂S réagit avec des sels de fer dans le milieu pour former du sulfure de fer, un précipité noir,

URE: Teste la présence de l'enzyme uréase, qui hydrolyse l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone. L'ammoniac produit alcalinise le milieu, provoquant un changement de couleur indicatif (par exemple, du jaune à rose vif dans un milieu contenant du rouge de phénol).

TDA (Tryptophane désaminase): Détecte l'enzyme tryptophane désaminase, responsable de la désamination du tryptophane en acide indole-3-pyruvique. Il faut ajouter le réactif TDA pour qu'il réagit avec le produit de désamination, donnant une couleur brune ou rouge si le test est positif.

IND: Test Indole - production d'indole à partir de tryptophane par l'enzyme tryptophanase. Réactif - L'indole est détecté par l'ajout du réactif de Kovac qui donne une couleur rouge au milieu si le test est positif.

VP : le test de Voges-Proskauer pour la détection de l'acétoïne (acétylméthylcarbinol) produite par fermentation du glucose par des bactéries utilisant la voie du butylène glycol. La lecture du test se fait par l'ajout des réactifs VP1 et VP2 pour former un complexe rouge, indiquant un résultat positif.

GEL: Détecte la production de l'enzyme gélatinase qui liquéfie la gélatine

GLU: fermentation du glucose (sucre hexose) ce qui implique la production des acides, diminuant le pH du milieu, ce qui est révélé par un indicateur de pH (par exemple, virant au jaune).

MAN: Vérifie la capacité de fermenter le mannose (sucre hexose), ceci entraîne une baisse du pH, détectée par un changement de couleur.

INO: Vérifie la capacité de fermenter l'inositol (polyalcool cyclique), provoquant une baisse du pH et un changement de couleur indicatif.

SOR: Vérifie la capacité de fermenter le sorbitol (sucre d'alcool), provoquant une baisse du pH et un changement de couleur indicatif.

RHA: Vérifie la capacité de fermenter le rhamnose (sucre de méthyl pentose), provoquant une baisse du pH et un changement de couleur indicatif.

SAC: Vérifie la capacité de fermenter le saccharose (disaccharide), provoquant une baisse du pH et un changement de couleur indicatif.

MEL: Vérifie la capacité de fermenter le mélibiose (disaccharide), provoquant une baisse du pH et un changement de couleur indicatif.

AMY: Vérifie la capacité de fermenter l'amygdaline (glycoside), provoquant une baisse du pH et un changement de couleur indicatif.

ARA: Vérifie la capacité de fermenter l'arabinose (sucre pentose), provoquant une baisse du pH et un changement de couleur indicatif.

ANNEXE 2 : Réactifs pour lecture indirecte des résultats de la galerie

Réactif TDA: Solution de chlorure ferrique, solution de chlorure de fer(III), réactif de déaminase du tryptophane. Pour l'identification des espèces de Proteus par détection de l'activité de la déaminase du tryptophane.

Le réactif de Kovac est utilisé pour déterminer la capacité des bactéries, principalement les entérobactéries, à produire de l'indole par la désamination du tryptophane. En présence d'indole libre, il se développe en quelques minutes une coloration rouge cerise dans la couche surnageante de réactif.

VP1: Hydroxyde de potassium

VP2: Alpha-naphtol

Les réactifs de VP sont utilisés pour mettre en évidence la voie fermentaire du butane-2,3-diol partir de la fermentation du glucose

L'huile de paraffine : est utilisée avec les galeries API, soit pour créer l'anaérobiose (absence d'oxygène), soit pour maintenir en solution les ions volatils produits par la réaction et ainsi assurer le virage de l'indicateur coloré de pH. Cette huile est utilisée pour les substrats dont le sigle est souligné.

Les masses des métaux prélevées pour la préparation des solutions ont été mesurées en utilisant le site suivant : <https://www.periodni.com/fr/rechercher.html>

Annexe 1: Résultats de mesure de l'absorbance par densité optique (DO) à 600 nm Tableau 7 :

Résultat de la mesure de l'absorbance(DO) à 600 nm

		K.pneumoniae	R.ornithinolytica	E.cloacae	C.freundii	A.Hydrophila	P.aeruginosa
Cadmium	100	1,45	1,307	1,334	1,342	0,887	0,482
	400	1,42	1,32	1,314	1,34	0,923	0,659
	1000	0,7881	1,008	0,742	0,814	0,186	0,324
	1600	0	0	0,113	0,003	0,043	0,266
	3200	0	0	0,234	0	0	0
Cobalt	100	1,176	1,249	1,287	1,246	0,711	0,519
	400	0,405	0,5	0,811	0,602	0,221	0,102
	1000	0,074	0,263	0,118	0,126	0,033	0,055
	1600	0	0,26	0	0	0	0
	3200	0	0	0	0	0	0
Cuivre	100	1,577	1,427	1,52	1,29	0,912	0,396
	400	1,083	0,961	0,861	0,729	0,069	0,674
	1000	0,29	0,623	0,055	0,089	0,001	0,757
	1600	0,18	0,246	0,152	0,118	0,136	0,818
	3200	0,112	0,073	0	0,057	0,166	0,112
A0	0	1,64	1,49	1,369	1,39	0,975	0,786

Annexe 2: Pourcentages de croissance mesurée par densité optique

Tableau 8 : Pourcentage de croissance mesuré

	Concentration du métal	K.pneumoniae	R.ornithinolytica	E.cloacae	C.freundii	A.Hydrophila	P.aeruginosa
cadmium	100	88	88	97	97	91	61
	400	87	89	96	96	95	84
	1000	48	68	54	59	19	41
	1600	0	0	8	0	4	34
	3200	0	0	17	0	0	0
cobalt	100	72	84	94	90	73	66
	400	25	34	59	43	23	13
	1000	5	18	9	9	3	7
	1600	0	17	0	0	0	0
	3200	0	0	0	0	0	0
cuivre	100	96	96	100	93	94	50
	400	66	64	63	52	7	86
	1000	18	42	4	6	0	96
	1600	11	17	11	8	14	100
	3200	7	5	0	4	17	14

* Les courbes ainsi que les histogrammes présentés dans ce document ont été réalisées à l'aide du logiciel Python.

Annexe 3: Emissions métalliques dans les rejets industriels

Tableau 9 : Emissions métalliques dans les rejets industriels

Emissions métalliques dans les rejets (mg/l)										
Industries	Pb	Cr	Fe	Cd	Zn	Mn	Ni	Cu	Co	Hg
SITEP/TUBOPLAST	<0,2	<0,2	<0,2	<0,03	<0,03	<0,03	<0,2	<0,1	<0,2	
S,A,E,L	<0,2	<0,2	2,4	<0,03	0,15	0,11	<0,2	<0,1	<0,2	<1
GRANITEX	1,7	0,7	144	<0,03	4,3	4,7	<0,2	0,8	<0,2	
ENPEC	244	0,6	13,3	0,012	0,64	0,2	0,04	0,1	<0,2	12
EDENAL		<0,2					<0,2			
ENAP		<0,2					<0,2			12,11
SIAD	<0,2	0,3	0,32	<0,03	0,13	0,11	<0,2	<0,1	<0,2	
ENAPAT	1,2	0,34	0,8	<0,03	0,8	0,15	<0,2	0,1	<0,2	
HYDROTARAITEMENT	22	0,68	887	<0,03	54	8,33	<0,2	0,5	<0,2	
CABLERIE CATEL	<0,2	<0,2	<0,2	<0,03	<0,03	0,21	<0,2	0,98	<0,2	
CNERU	0,4	<0,2	7,4	<0,03	1,2	0,2	<0,2	<0,1	<0,2	
Tan SEMMAche	2,23	60,43		0,012				0,03		11,04
ENMTP	0,2				0,01		0,05			8,36
Tan KEHRI	0,27	0,54					0,01			8
EMB1	2,4				1,47		0,07	0,5		21,21
BAG	0,45				0,6		0,05	1,9		3,54
Ets KEHRI	0,23	0,96			1,08		0,02	0,36		7,28
AGENOR	0,34	0,15					0,27	8,86		17
Raff D'alger	0,51						0,03			18
SAIIDAL	0,19									1,5
CATEL	0,94				0,63		0,04	4,84		
AVENTIS	0,38				0,71		0,02	0,71		
SOACHLORE	1	3		0,2	5		5	3		5720
VMA										10
Normes de rejets	0,5	0,5	3	0,2	3	1	0,5	0,5		10

Annexe 4: Concentrations des métaux dans les eaux et les sédiments de l'Oued El Harrach et ses confluent

Tableau 10 : Concentrations des métaux dans les eaux

Concentrations des métaux dans les eaux (mg/l)	Oued El Harrach			Oued El Samar			Oued Baba Ali		
	OH1	OH2	OH3	OS4	OS5	OS6	OB7	OB8	OB9
Cd	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Cr	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	0,54	0,5
Cu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,24	<0,1
Mn	0,27	-	0,15	0,26		0,15	0,37	-	0,38
Ni	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Pb	0,37	0,73	0,6	0,53	0,57	0,6	0,37	0,89	0,8
Zn	0,14	<0,03	0,13	0,16	<0,03	<0,03	19	1,2	0,58
Hg	<1	2,4	1,82	<1	7,2	1,15	<1	1,2	1,15
Fe	5,3	<0,2	1,17	6,4	0,5	<0,2	7,7	23	6,2

Tableau 11 : Concentrations des métaux dans les sédiments

Concentrations des métaux dans les sédiments (mg/Kg)	Oued El Harrach			Oued El Samar			Oued Baba Ali		
	OH1	OH2	OH3	OS4	OS5	OS6	OB7	OB8	OB9
Fe	6,32E+02	5,92E+02	6,73E+02	5,92E+02	2,86E+02	7,75E+02	6,32E+02	3,26E+02	3,26E+02
Zn	4,69E+00	2,65E+01	4,45E+00	4,30E+00	7,75E+00	8,28E+00	2,65E+01	2,24E+01	5,18E+00
Mn	8,16E+00	5,51E+00	5,81E+00	7,14E+00	3,47E+00	1,00E+01	9,73E+00	5,71E+00	4,84E+00
Cu	8,98E-01	3,06E+00	9,38E-01	1,31E+00	1,82E+00	1,39E+00	3,47E+00	2,24E+00	6,94E-01
Pb	3,47E+00	4,08E+00	1,69E+00	2,94E+00	2,65E+00	2,80E+00	6,53E+00	3,47E+00	1,69E+00
Cr	1,16E+00	1,31E+01	3,43E+00	2,45E+00	1,55E+00	1,55E+01	1,02E+01	3,88E+00	1,49E+00
Ni	8,16E-01	8,16E-01	8,16E-01	8,16E-01	8,16E-01	1,02E+00	8,16E-01	8,16E-01	8,16E-01
Cd	1,22E-01	1,22E-01	1,22E-01	1,22E-01	1,22E-01	1,22E-01	1,22E-01	1,22E-01	1,22E-01
Hg	0,00E+00	7,00E-05	1,00E-05	0,00E+00	2,14E-03	1,00E-05	0,00E+00	1,00E-05	1,00E-05