

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل
Ecole National Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état et
Master
Option : Biotechnologie Marine**

Thème:

**Evaluation et isolement des bactéries tolérantes aux métaux
lourds**

Présenté par :

BOUCHARIA INES

Soutenu le 28/09/2022 devant le jury composé de :

Mme AMAR I.	Maître assistante classe A	ENSSMAL	Présidente
Mme ALOUACHE S.	Maître de conférences classe A	ENSSMAL	Promotrice
Mme. CHAOU N.	Maître assistante classe A	ENSSMAL	Examinatrice
M. KADA M.	Maître assistant classe A	ENSSMAL	Examinateur

Année universitaire : 2021 / 2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل
Ecole National Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état
et Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Hydrobiologie Marine et Continentale
Spécialité : Biotechnologie Marine**

Thème:

**Evaluation et isolement des bactéries tolérantes aux métaux
lourds**

Présenté par :

BOUCHARIA INES

Soutenu le 28/09/2022 devant le jury composé de :

Mme AMAR I.	Maître assistante classe A	ENSSMAL	Présidente
Mme ALOUACHE S.	Maître de conférences classe A	ENSSMAL	Promotrice
Mme. CHAOU N.	Maître assistante classe A	ENSSMAL	Examinatrice
M. KADA M.	Maître assistant classe A	ENSSMAL	Examinateur

Année universitaire:2021/2022

Remerciements

*En préambule à ce mémoire, je tiens tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux, qui m'aide et qui m'a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Au terme de ce modeste travail, j'exprime tout d'abord mes profonds remerciements à **Mme ALOUACHE SOUHILA** maître de conférences classe A au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral ENSSMAL, pour la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de ce travail. Je la remercie pour sa disponibilité malgré ses nombreuses charges et ses pertinents conseils. J'ai beaucoup appris à ses côtés, soyez assurée Madame de mon attachement et de ma profonde gratitude.*

*J'exprime toute ma gratitude à **Mme. AMAR IMEN** maitre assistante classe A au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral ENSSMAL, d'avoir bien voulu juger ce travail et accepter de présider le jury de ce travail.*

*Je remercie particulièrement **Mme CHAOU NADIA** maitre assistant classe A au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral ENSSMAL, pour l'aide qu'elle m'a apporté pour la récupération des échantillons utiliser dans cette étude et aussi de m'avoir fait honneur d'examiner et d'évaluer ce travail.*

*Je tiens à remercier monsieur **KADA MOHAMED** maitre assistant classe A au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral ENSSMAL, pour ses encouragements et pour l'aide et les conseils qu'il m'a prodigué au cours de mon stage pratique de recherche et aussi de m'avoir fait honneur d'examiner et d'évaluer ce travail.*

*Nous ne saurons oublier **Mr DJERRAI NOUREDDINE**, Ingénieur de laboratoire au niveau de l'ENSSMAL pour son aide et ses multiples conseils, son dynamisme et de son efficacité. C'était un grand plaisir de travailler à ses côtés.*

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements et tout mon amour à mes parents, mes frères et ma sœur, ainsi qu'à tous mes proches amis qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances

Remerciements

Dédicaces

Je tiens à dédier ce travail

A la lumière de mes jours, à la flamme de mon cœur, à celle qui a été ma mère, ma sœur et même mon amie, celle qui sans elle je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui. Puisse dieu te donner santé, bonheur et courage.

A ma très chère grand-mère « youmma »

A ma très chère mère

Je ne trouverais jamais les mots justes pour exprimer combien je te remercie de m'avoir soutenue, d'avoir cru en moi toutes ces années, d'avoir éveillé ma curiosité, mon appétit de découverte, d'avoir aiguisé mon sens critique, d'avoir fait de moi quelqu'un d'heureux et de libre. Merci d'avoir été une mère exceptionnelle que je garderais toujours dans mon cœur. que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir. Je t'aime maman.

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

A toi mon père.

A mon très cher frère «Azzeddine»

Au témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour toi. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

A mon trésor mon petit frère «Salah»

A ma perle précieuse, ma petite sœur «Maroua»

À la plus belle et la plus douce tante «Zakia»

Ma conseillère, et ma deuxième mère, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles....

Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.

A toute ma famille et à tous mes amis.

" و الحمد لله رب العالمين "

TABLE DES MATIERES

Table des matières	i
Liste des abréviations	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Introduction	2
Chapitre I:	4
Synthèse bibliographique	4
I. Les métaux dans le milieu marin.....	3
I.1. Définition des métaux lourds :	3
I.2. Classification des métaux lourds	5
I.3. Propriétés physico-chimiques des métaux lourds :	5
I.5. Effets toxiques des métaux lourds	8
II. Bactéries marines tolérantes aux métaux :	9
II.1. Notion de résistance et tolérance	9
II.2. Réponse bactérienne à une exposition métallique.....	9
II.3. Toxicité des métaux lourds :	10
II.5. Mécanismes de résistance :	11
III. La bioremédiation par les microorganismes:.....	17
Chapitre II :Matériel et méthodes	19
II.1. Présentation des stations d'étude	21
II.1.1. Plage colonel abbes (Embouchure de oued Mazafrane)	21
II.1.2. Plage Khelloufi :	22
II.1.6. Plage Hôtel Riadh (Sidi Fredj)	23
II.1.3. Plage bateau cassé	24
II.1.4. Plage la sirène :	25
II.1.5. Plage Flots bleus (Ain Taya)	26
II.2. Echantillonnage:	27

TABLE DES MATIERES

II.3 Analyse microbiologique :	28
II.3.1. Préparation des dilutions	28
II.3.2. Dénombrement de la flore totale bactérienne et les coliformes totaux	28
II.4. Evaluation de la résistance aux métaux lourds	29
II.5. Conservation et mise en place d'une collection de souches résistantes aux métaux lourds	30
II.6. Identification de la flore bactérienne :	30
II.6.1. Coloration de GRAM:	31
II.6.2. Identification biochimique des bacilles à Gram négatif : Galerie API20E	31
II.6.3. Identification des cocci à GRAM positif.....	32
II.7. Détermination du profil de résistance aux métaux lourds des souches bactériennes isolées:	36
Chapitre III : Résultats et discussion	38
III.1. Evaluation de la qualité bactériologique des échantillons :.....	38
III.1.1. Résultats de recherche de la flore mésophile aérobies totale :.....	38
III.1.2. Résultats de recherche des coliformes totaux:	39
III.2. Prévalence de la résistance aux métaux lourds chez la flore totale:.....	39
III.2.1. chez la flore totale:.....	39
III.2.2. chez les coliformes:.....	42
III.3. Identification de la flore bactérienne résistante aux métaux lourds:	42
III.3.1. La coloration GRAM :.....	42
III.3.2. Identification biochimique :	46
III.3. Résultats du test de résistance aux métaux lourds des souches bactériennes isolées :.....	53
Conclusion	54
Références bibliographiques	54
Résumé	

Liste des abréviations

Symbole	Définitions
°C	Degrés Celsius
µg	Microgramme
ABC	ATP Binding Cassette
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
Al	Aluminium
As	Arsenic
ATP	Adénosine-5'-TriPhosphate
ATPase	Adénosine TriPhosphatase
BHIB	Brain heart infusion broth
Cd	Cadmium
CDF	Cation Diffusion Facilitator
CorA	Protéine de transport du cobalt et du magnésium
Cr	Chrome
CT	Coliformes totaux
Cu	Cuivre
EPS	Substances Polymériques Extracellulaires
Gx	Grossissement
H	Hydrogène
Hg	Mercure
Kg	Kilogramme
Km	Kilomètre
mg	Milligramme
Mg	Magnésium
MH	Milieu Muller Hinton
ml	Millilitre
Mn	Manganèse
Ni	Nickel
O	Oxygène
Pb	Plomb
RND	Resistance-Nodulation-Cell Division
Ti	Titanium
Z	Nombre atomique
Zn	Zinc

Liste des figures

Figure I.1 : Tableau de Mendeleïev.....	4
Figure I.2: Origine des métaux lourds.....	7
Figure I. 3: schématisation des interactions entre métaux et bactéries.....	10
Figure I.4. Exemples de quelques mécanismes de résistance bactérienne aux métaux lourds.....	12
Figure I.5 : Structure RMN de la métallothionéine bactérienne Zn4SmtA.....	13
Figure I. 6. Mécanismes de résistance au mercure.....	16
Figure I.7. Résistance au cuivre chez <i>E. coli</i>	17
Figure II.1: Localisation du site d'étude plage colonel abbes (Embouchure d'oued Mazafrane).....	22
Figure II.2: Localisation du site d'étude plage Khelloufi (Zeralda).....	23
Figure II.3: Localisation du site d'étude plage Hôtel Riadh (Sidi Fredj).....	24
Figure II.4 : Localisation du site d'étude plage Bateau cassé.....	25
Figure II.5: Localisation du site d'étude plage la sirène.....	26
Figure II.6: Localisation du site d'étude plage flots bleus Ain Taya.....	27
Figure II.7 :dénombrement après culture bactérienne.....	28
Figure II.8 :schéma explique l'étape de conservation et mise en place d'une collection des souches bactériennes résistantes aux métaux lourds.....	31
Figure II.9: Identification biochimique Galerie API20E.....	34
Figure II.10 : Schéma représente les étapes d'identification des cocci à GRAM positifs.....	35
Figure II.11 : Test biochimiques de confirmation.....	37
Figure III.1 : Résultats de recherche des coliformes totaux et la FMAT.....	38
Figure III.2: la résistance aux métaux lourds chez la flore totale.....	40

Liste des figures

Figure III.3: la résistance aux métaux lourds chez les coliformes totaux.....	42
Figure III.4 : Illustration de bactéries à GRAM négatif de forme cocco-bacille (GX100).....	44
Figure III.5 : Illustration de cocci à GRAM positif en chaînette (GX100).....	45
Figure III.6 : illustration de bacille à Gram négatif de (GX100).....	45
Figure III.7 : profil biochimique de l'espèce <i>Stenophomonas maltophilia</i>	49
Figure III.8 : Profil biochimique de l'espèce <i>Escherichia coli</i>	49
Figure III.9 : Profil biochimique de l'espèce <i>Pseudomonas luteola</i>	49
Figure III.10 : colonies entourées d'un halot noir sur milieu BEA.....	50
Figure III.11 : Répartition des souches identifiées résistantes aux métaux lourds (n=21).....	51

Liste des tableaux

Tableau01 : Résultats de la coloration de Gram pour 35 souches résistantes aux métaux lourds isolées des différentes plages.....	43
Tableau02: Résultats de l'identification de 17 souches à Gram négatif résistantes aux métaux lourds par la galerie API20E.....	46
Tableau 03 : résultats de la répartition des souches résistantes aux métaux lourds (n=21).....	51
Tableau04 : les résultats de profil de résistance des souches isolées.....	55

INTRODUCTION

Introduction

L'eau n'est pas seulement une ressource destinée à la consommation humaine, c'est également composante essentielle de tous les organismes vivants et de tous les écosystèmes. Elle traverse les paysages et constitue des milieux de vie riches à forte valeur patrimoniale (Sigg *et al.*, 2001). Les réserves disponibles d'eaux naturelles comprennent l'eau de surface stagnantes (lacs, retenues de barrages), l'eau souterraines (infiltration, nappes), ou en écoulement (rivières, fleuves) et l'eau de mer (Malleval et Chambolle, 1990).

En raison de leurs utilisations multiples, les ressources en eau sont fortement dégradées, des pollutions ponctuelles et diffuses ont conduit à une modification des caractéristiques physico-chimiques, microbiologiques et une répercussion très forte sur la biodiversité aquatique (Malmqvist et Rundle, 2002 ; Sweeney *et al.*, 2004). De nouvelles niches écologiques sont apparues suite au rejet dans l'environnement de déchets industriels toxiques constitués généralement d'un mélange de métaux lourds, de composés organiques et d'hydrocarbures (Monchy, 2007).

Les métaux lourds, composés stables et hautement persistants, sont des contaminants de l'environnement; qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (DeForest *et al.*, 2007, Croteau *et al.*, 2005). Certains métaux sont souvent toxiques à faible concentration (Mills and Colwell, 1977) et les microorganismes sont les premiers organismes affectés par cette toxicité (Giller *et al.*, 1998).

Une exposition des microorganismes à des concentrations toxiques en contaminants métalliques, sous leur forme bio-disponible, favorise d'une part, la croissance des bactéries portant des gènes spécifiques de résistances ou détriment des bactéries sensibles et d'autre part, le transfert de gènes de résistance au sein des communautés bactériennes (Gadd, 1992).

Pour faire face à la persistance de métaux lourds dans l'environnement, les bactéries ont élaborées plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et/ou de croître, ces mécanismes étant dans plusieurs cas véhiculés par des plasmides (Silver, 1996).

Barcina *et al.* (1997) et Arana *et al.* (1997) ont montré que les bactéries porteuses de plasmides survivent mieux que les bactéries démunies à cause des multiples propriétés véhiculées par ces éléments génétiques. La possibilité du transfert de leur caractères de résistance dans l'environnement extérieur a inquiété la communauté scientifique, à cause des risques écologiques et sanitaires, et a enclenchée des études expérimentales sur ces sujets (Endo *et al.*, 2002).

L'Algérie a connu une forte croissance démographique au cours des dernières décennies, l'urbanisation massive et le développement des activités industrielles ont créé une pollution importante des ressources en eau (Bouziani, 2000).

La baie d'Alger est soumise aux perturbations anthropiques de différentes origines causées par une population humaine de plus de 4,3 millions d'habitants qui vivent dans la métropole d'Alger. En outre, près de 1000 entreprises opèrent dans différents domaines et se partagent cette baie : métallurgie, construction, pétrochimie, production pharmaceutique, industries mécaniques, électriques et électroniques, agro-alimentaire, production de papier... etc. (Boukri et Rezzeli, 2019)

Selon les connaissances du chercheur, jusqu'à présent aucune recherche n'avait été entreprise au niveau d'eau de mer en Algérie, or, nous devrions considérer comme possible, le fait que la pollution du milieu notamment par les métaux puisse sélectionner des bactéries métallo-résistantes capables de survivre et de jouer un rôle dans la recolonisation de tels environnements. En plus, de cette valeur écologique et environnementale, cette étude nous permettra d'isoler des bactéries avec un potentiel de tolérance de ces métaux qui peut être utilisé pour la réhabilitation de certains sites et de traiter les effluents de plusieurs entreprises métallurgiques.

De ce fait l'objectif de notre travail est :

- ✓ Evaluer la résistance aux métaux lourds chez des bactéries dans des zones à différents apports anthropiques
- ✓ Isolement des bactéries résistantes aux métaux lourds et caractérisation phénotypique des profils de résistance aux métaux lourds.

Notre travail sera organisé en 3 chapitres :

- o Le premier est purement théorique qui rassemble d'une part des généralités sur les métaux lourds dans le milieu marin et d'autre part la résistance bactérienne aux métaux lourds et quelques utilisations biotechnologiques des bactéries résistantes (la bioremédiation).
- o Le second, chapitre est expérimental consacré aux méthodes utilisées pour l'analyse bactériologique et la recherche des bactéries tolérantes.
- o Le troisième chapitre, présente les différents résultats obtenus au cours de notre étude avec une discussion.

Enfin, une conclusion achèvera ce travail.

Chapitre I:

Synthèse bibliographique

I. Les métaux dans le milieu marin

I.1. Définition des métaux lourds :

Les éléments du tableau périodique peuvent être classés, en fonction de certaines propriétés physiques et chimiques, en métaux et non métaux, à l'exception d'un petit nombre qualifié de métalloïdes. Le terme métaux lourds est un mot ambigu et sa définition varie d'une source à l'autre, jusqu'à présent il n'existe pas de définition générale mais selon (Nies, 1999), ils peuvent être définis comme : Tout métal ayant une densité supérieure à 5g/cm^3 , ayant un numéro atomique élevé supérieur à celui du Sodium ($Z=11$) et pouvant être toxique pour les systèmes biologiques (Bendjama, 2007).

Le terme élément trace métallique (ETM) est également utilisé pour décrire les métaux lourds car ils se retrouvent souvent en très faibles quantités dans l'environnement (Baker et Walker, 1990). Parmi les éléments recensés dans la classification périodique de Mendeleïev, 53 sont considérés comme des métaux lourds (Figure I.1).

Vingt-deux de ces ETM sont définis au titre d'éléments traces et peuvent être organisés en quatre classes selon leurs concentrations naturelles utilisées comme valeur de référence dans l'eau de mer (Weast *et al.*, 1984) (Figure I.1) :

- Les métaux les plus fréquents dont les concentrations sont comprises entre $0,1$ et $1\ \mu\text{M}$ (fer, molybdène et zinc).
- Les métaux moins fréquents dont les concentrations sont comprises entre 10 et $100\ \text{nm}$ (arsenic, cuivre, étain, manganèse, nickel, uranium et vanadium).
- Les métaux rares dont les concentrations sont comprises entre 1 et $10\ \text{nM}$ (antimoine, argent, cobalt et cérium).
- Les métaux très rares dont les concentrations sont inférieurs à $1\ \text{nM}$ (cadmium, chrome, gallium, mercure, plomb, thorium, tungstène et zirconium).
- Les trente-et-un métaux de concentrations très inférieures à $1\ \text{nM}$ ne sont pas considérés comme des éléments traces car ils n'ont aucune utilité biologique ou toxicité intrinsèque.

The periodic table displays elements with their atomic number, symbol, and name. The groups are labeled at the top: 1 (IA), 2 (IIA), 3 (IIIB), 4 (IVB), 5 (VB), 6 (VIB), 7 (VIIB), 8 (VIII), 9 (IX), 10 (X), 11 (XI), 12 (XII), 13 (IIIA), 14 (IVB), 15 (VA), 16 (VIA), 17 (VIIA), and 18 (VIIIA). The elements are color-coded according to their ETM (Electromagnetic Tomography) ranges:

- Primordial:** Elements with white backgrounds, including H, He, Li, Be, B, C, N, O, F, Ne, Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, Ar, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Kr, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac, Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr.
- Desintégration d'autres éléments:** Elements with black backgrounds, including U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr.
- Synthétique:** Elements with dotted backgrounds, including Pm, At, Po, Rn, Fr, Ra, Ac, Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr.
- ETM (0,1 à 1 µM):** Elements with orange backgrounds, including Sr, Fe, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Kr, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac, Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr.
- ETM (10 à 100 nM):** Elements with red backgrounds, including Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Kr, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac, Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr.
- ETM (1 à 10 nM):** Elements with blue backgrounds, including Sr, Fe, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Kr, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac, Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr.
- ETM (<1 nM):** Elements with green backgrounds, including Sr, Fe, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Kr, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac, Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr.

Figure I.1 : Tableau périodiques des éléments. (Mendeleïev, 1869).

Les cinquante-trois ETM sont définis comme des métaux métalliques naturels, des métaux ou des métalloïdes de densités supérieures à 5 g.cm^{-3} et sont représentés en gris. Les métaux les plus courants sont encadrés en orange, les métaux moins courants sont encadrés en rouge, les métaux rares sont encadrés en bleu et les métaux très rares sont encadrés en vert. (Figure I.1)

I.2. Classification des métaux lourds

D'un point de vue biologique, deux types de métaux lourds peuvent être distingués en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques.

I.2.1. Métaux essentiels

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se retrouvent en très faible proportion dans les tissus biologiques (Loué, 1993), ils interviennent dans de nombreuses réactions enzymatiques et jouent un rôle important dans le métabolisme des protéines, des lipides et des glucides, cependant ils peuvent devenir toxiques lorsque leur concentration dépasse un certain seuil (Kabata Pendias et Pendias, 2001).

I.2.2. Métaux non essentiels

Métaux non essentiels ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule, c'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg) et du cadmium (Cd) (Chiffolleau *et al.*, 2004).

I.3. Propriétés physico-chimiques des métaux lourds :

Un métal est une matière, issue le plus souvent d'un minerai ou d'un autre métal, dotée d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité (Boufligha *et al.*, 2013).

La solubilité des métaux lourds dépend de l'élément concerné, du chimisme de la phase aqueuse (pH, potentiel redox, concentration en ligands) et des phases solides environnantes, qui interagissent avec la composition de cette phase (Boufligha *et al.*, 2013).

L'hydrosolubilité de nombre de métaux est fortement accrue par l'acidité. Les valeurs de pH inférieures à 6, rares dans les sols naturels, peuvent se rencontrer en présence d'autres contaminants (Boufligha *et al.*, 2013).

Les métaux lourds sont à considérer comme non volatils et indéfiniment stables. Leur stabilité en solution est la durée nécessaire pour qu'ils rencontrent un piège chimique (phase précipitée) qui les fixe (Lemière *et al.*, 2001).

I.4. Les métaux dans l'environnement**I.4.1. La pollution, une problématique contemporaine**

Les estuaires et les milieux côtiers font partie des zones les plus exposées aux différents types de pollution, entre autres métallique, qu'il s'agisse d'apports directs dus à l'industrialisation et à l'urbanisation, souvent importantes dans ces zones, ou encore les apports indirects par les rivières et par voie atmosphérique (BRYAN, 1984). C'est pourquoi les êtres vivants qui peuplent ces milieux sont souvent exposés à des pollutions métalliques multi-élémentaires (BERTHET & al., 1985). Les problèmes de pollution d'aujourd'hui, en particulier la pollution marine, sont originaire de la façon dont la société humaine s'est développée depuis le 19^{ème} siècle surtout leurs méthodes de production d'énergie. En fait, depuis plus de 100 ans, la plupart des écosystèmes ont subi des changements majeurs liés à l'activité humaine (agriculture, industrialisation, déforestation, urbanisation, etc.) en raison de croissance démographique et économique stable (Bauvais, 2015).

I.4.2. Origine des pollutions métalliques marines

Une pollution se définit par l'introduction de substances toxiques dans un écosystème naturel incapable de les dégrader et dont l'équilibre se trouve affecté de façon réversible ou irréversible (Hill, 2004).

Les pollutions métalliques marines auraient principalement une origine terrestre. Ces polluants peuvent être naturellement présents dans l'environnement et parvenir jusqu'aux mers par le lessivage des sols et l'érosion mécanique ou chimique des roches (Nisbet and Fowler, 1995).

Ils peuvent aussi être le produit des activités anthropiques liés aux rejets industriels, agricoles, urbains ou miniers et être transportés par les fleuves, l'air, le drainage des terres ou les rejets volontaires (Goldberg, 1995; Hill, 2004).

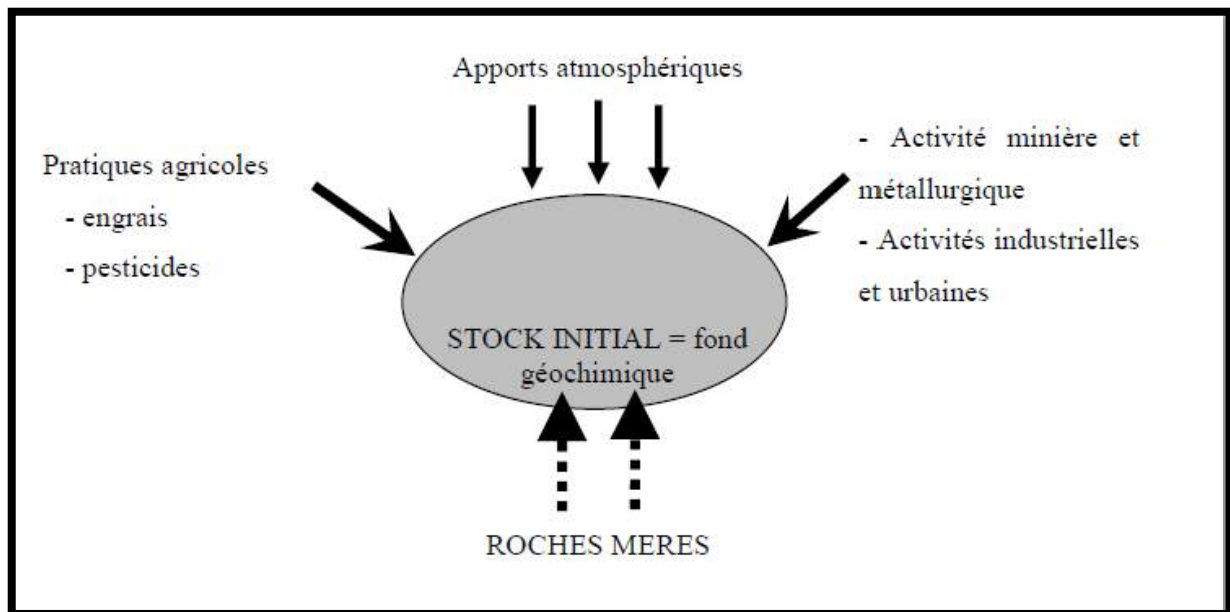


Figure I.2: Origine des métaux lourds (Robert et Juste, 1999).

I.4.2.1. Cas du cuivre

Principalement utilisé dans l'agriculture et dans l'industrie, le cuivre a fait l'objet d'une utilisation intensive dans les peintures antifouling pour les coques de navires (Katranitsas *et al.*, 2003; Schiff *et al.*, 2004) en remplacement du toxique tributylétain depuis les années 1980 (Claisse and Alzieu, 1993).

I.4.2.2. Cas du zinc

Le zinc est naturellement présent dans l'environnement sous forme de sulfure. Ses sources artificielles sont principalement la métallurgie lors de la fabrication d'alliages, de pigments, de piles électriques ou lors de la combustion de bois ou de charbon et les épandages agricoles. Par ailleurs, on le trouve fortement concentré dans les zones portuaires soumises à la dissolution des peintures antirouille et des anodes qui protègent les coques de bateaux (INERIS, 2010).

I.4.2.3. Cas du mercure :

C'est un élément métallique naturellement présent dans la croûte terrestre à une concentration d'environ 0,02mg/kg. De plus, le mercure, largement utilisé dans diverses activités anthropiques (productions industrielles de batteries, câbles et interrupteurs électriques, appareils de mesure, amalgames dentaires, lampes, fabrication artisanale ou industrielle de l'or, l'incinération des déchets, etc.) est abondamment rejeté dans l'environnement (UNEP, 2013).

I.4.2.4. Cas de cadmium :

Le cadmium est un élément relativement rare présent dans la croûte terrestre faible concentration. Ces principales formes cristallines sont le greenockite et l'hawleyite (CdS), l'otavite (CdCO₃), le montéponite (CdO) et la cadmosérite (CdSe). L'enrichissement en cadmium des sols et des systèmes aquatiques résulte de l'altération des matériaux de la croûte terrestre et des retombés atmosphériques (Garin et Simon, 2004).

La dispersion du cadmium dans les systèmes aquatiques est liée aussi aux nombreuses activités industrielles et à l'épandage d'engrais phosphatés faisant intervenir cet élément atmosphériques (Garin et Simon, 2004).

I.5. Effets toxiques des métaux lourds

I.5.1. Effets toxiques sur la santé humaine

La toxicité des métaux lourds n'est plus à démontrer elle est reconnue depuis l'Antiquité, leurs présence est responsable des nombreuses maladies connues chez l'Homme. Une surcharge en fer entraîne une thalassémie, cataracte ou une hémochromatose. Une perturbation dans l'homéostasie du cuivre peut être à l'origine de troubles neurologiques graves comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Certains métaux peuvent entrer en compétition avec des ions physiologiques ce qui peut inhiber les fonctions propre de ces derniers (Nies, 1999). Un autre exemple est celui du nickel, qui est soluble dans les lipides et les graisses sous-cutanée. Ainsi sous la forme Ni²⁺, il peut interagir avec les acides aminés de la peau tels que les histidines ou les cystéines (Savolainen, 1996). Enfin, leurs propriétés redox peuvent conduire à de la formation de radicaux libres créant ainsi un stress important (Nelson, 1999 ; Nies, 1999).

1.5.2. Effets toxiques sur les organismes aquatiques

La contamination par des métaux peut avoir des effets toxiques sur la vie aquatique, à faibles concentrations, beaucoup de métaux lourds peuvent inhiber la photosynthèse et la croissance des microorganismes (Burnol *et al.*, 2006). Aussi des effets indésirables ont été observés chez les poissons, les mollusques et les crustacés qui se manifestent par un retard du développement embryonnaire, des malformations, une croissance tardive des adultes (Zhao *et al.*, 2000), des perturbation de la reproduction et l'augmentation ou la baisse du taux des bio marqueurs de défenses (Huynh, 2009)

II. Bactéries marines tolérantes aux métaux :

II.1. Notion de résistance et tolérance

Dans la littérature scientifique courante, se rapportant à la croissance ou à la survie des microorganismes en présence de certaines concentrations de métaux lourds, on parle souvent soit de tolérance soit de résistance. Il est très difficile de distinguer une différence entre les deux termes. Le Conseil de la Recherche National de Canada définit globalement la résistance et la tolérance comme la capacité d'un organisme à diminuer sa réponse face à un composé chimique relatif auquel il a été exposé précédemment (Wright et Welbourn, 2002).

II.2. Réponse bactérienne à une exposition métallique

Chez les bactéries, certains métaux, dits essentiels, comme le nickel, le fer, le zinc ou le cuivre jouent un rôle essentiel dans certaines réactions biochimiques, sont indispensables à la régulation de la pression osmotique intracellulaire mais sont toxiques à fortes concentrations (Ji and Silver, 1995). D'autres métaux, dits toxiques, comme le mercure, le cadmium, le plomb ou l'argent, interagissent de façon covalente ou ionique avec les composants cellulaires essentiels. A des concentrations qui dépassent les capacités physiologiques des cellules, les métaux essentiels et toxiques peuvent endommager les membranes cellulaires ou la structure de l'ADN, altérer des enzymes spécifiques et les fonctions physiologiques sous-jacentes (Bruins *et al.*, 2000).

Pour survivre dans des environnements contaminés en métaux, les bactéries ont développé une mécanique complexe de régulation de leur homéostasie. Elles pallient ainsi leurs effets toxiques à de fortes concentrations (Nies, 1999). Cette homéostasie résulte de la coordination des systèmes de prise en charge, de stockage et de sécrétion des métaux lourds.

Il existe, en effet, une grande diversité de systèmes de régulation du métabolisme des métaux lourds dont l'expression des gènes est généralement régulée par la concentration dans le milieu (Figure I.3) (Silver and Walderhaug, 1992; Lloyd, 2002)

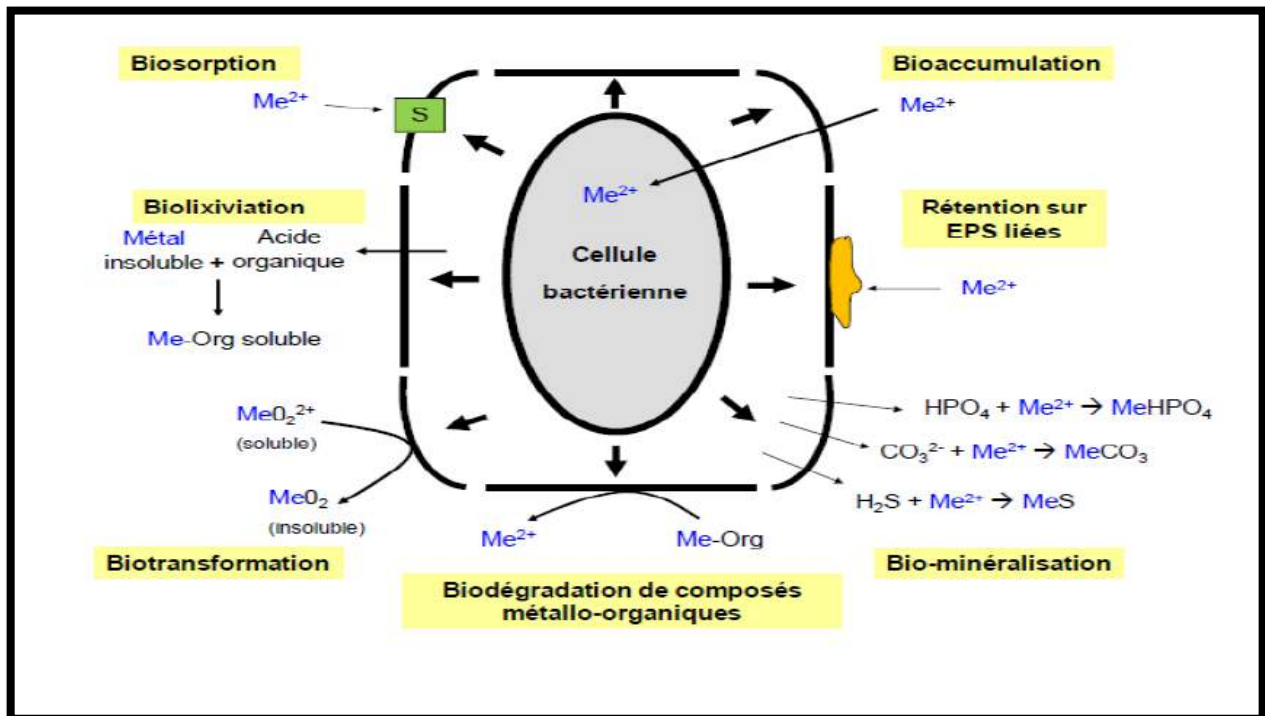


Figure I.3: schématisation des interactions entre métaux et bactéries (adaptée de Ledin, 2000). M^{2+} : un cation métallique. org : un composé organique. S groupement réactifs présents sur la paroi bactérienne. EPS : Substances Polymériques Extracellulaires.

II.3. Toxicité des métaux lourds :

Il existe trois origines de toxicité intracellulaires des cations de métaux lourds : la modification de la structure des acides nucléiques, l'inhibition des activités enzymatiques et l'interaction avec des dérivés réactifs de l'oxygène. La forte affinité des cations métalliques lourds pour les groupements phosphates ou soufrés entraîne la modification de la structure des acides nucléiques, empêchant ainsi la transcription et la traduction des gènes (Hengstler *et al.*, 2003).

De plus, les cations métalliques présents en excès dans la cellule vont entrer en compétition avec les cations physiologiques et en inhiber la fonction en se fixant sur les résidus cystéines, acide glutamique ou acide aspartique des sites actifs enzymatiques, ce qui provoque une inhibition de leurs activités (Nies, 1999).

Enfin, les cations métalliques peuvent interagir avec les espèces réactives de l'oxygène et former, par la réaction de Fenton, des radicaux libres qui endommagent alors l'ADN et les protéines (Braymer and Giedroc, 2014). Chez les bactéries à Gram-négatif, ils peuvent se lier au glutathion et conduire à la formation de complexes bisglutathions qui ont tendance à réagir avec l'oxygène moléculaire (Kachur *et al.*, 1998).

II.4. Systèmes d'import des métaux lourds

Il existe deux types de systèmes d'import des cations métalliques lourds chez les cellules bactériennes :

Le premier est un système passif exprimé constitutivement, qui incorpore rapidement les ions au travers des membranes plasmiques bactériennes de façon non-spécifique en fonction du gradient chimio-osmotique. Il est constitué par des protéines de la famille des MIT (Metal Inorganic Transport), comme CorA pour le transport du nickel, du cobalt, du zinc ou du manganèse. Cette "porte ouverte" est la raison principale pour laquelle les métaux lourds sont toxiques. L'expression des gènes de la famille MIT peut être diminuée par mutation et ces mutants deviennent tolérants aux métaux. (Silver et Phung, 2005)

Le second système de transport est un système actif lent d'import qui possède une forte affinité pour son substrat et utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Sa production est induite en fonction du gradient chimio-osmotique et des besoins de la cellule (Nies and Silver, 1995). Les ATPases de type P assurent l'import du manganèse, du magnésium, du calcium, du potassium, du cuivre, du zinc, du cadmium, du plomb et de l'argent (Fagan and Jr, 1994). Ces ATPases sont des pompes à cations qui doivent leur nom à la phosphorylation transitoire d'un résidu aspartate conservé pendant leur cycle réactionnel (Kühlbrandt, 2004).

II.5. Mécanismes de résistance :

Les bactéries tolérantes aux métaux lourds ont évolué de divers mécanismes de résistance qui sont codées par des gènes situés sur les chromosomes, les plasmides de taille différente, ou les transposons. Les métaux lourds (essentiels ou non essentiels) peuvent endommager les membranes des cellules, changer la fonction des enzymes spécifiques, perturber les fonctions cellulaires, et endommagent la structure d'ADN (Abskharon et al, 2008).

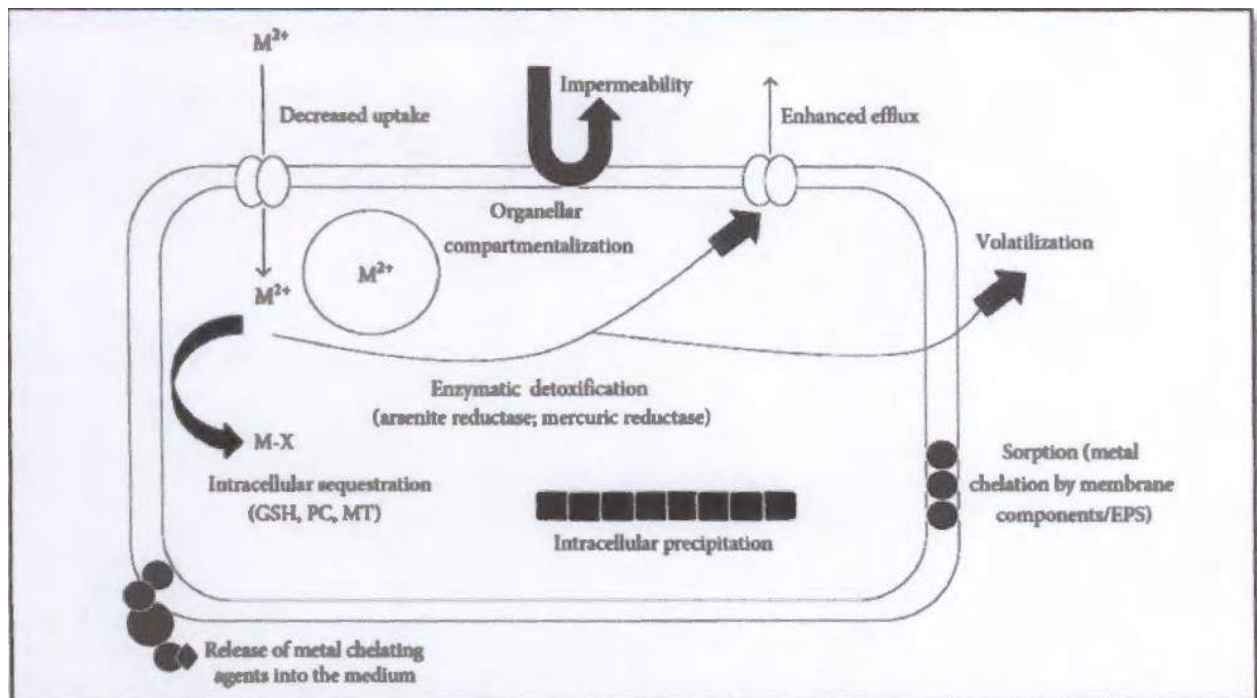


Figure I.4. Exemples de quelques mécanismes de résistance bactérienne aux métaux lourds (Srivastava et Kowshik, 2013).

II.5.1. Modifications dans la paroi cellulaire

La membrane ou l'enveloppe d'un microorganisme sont des barrières de la perméabilité membranaire. Ce mécanisme est une tentative effectuée par l'organisme pour protéger les composants cellulaires essentiels sensibles aux métaux (Rouch *et al.*, 1995).

II.5.2. Séquestration

C'est la première ligne de défense pour l'immobilisation rapide des métaux lourds afin d'éviter leurs effets toxiques dans la cellule (Latendre, 2009). La séquestration des ions métalliques, qui peut être intra- ou extracellulaire, permet d'immobiliser rapidement les métaux par des interactions physico-chimiques et en limiter les effets toxiques en combinaison avec d'autres mécanismes de résistances (Gadd, 1990).

II.5.2.1. La séquestration intracellulaire

La séquestration intracellulaire ou bioaccumulation correspond à l'accumulation de métaux dans le cytoplasme pour en diminuer la biodisponibilité et préserver les composants cellulaires essentiels. Elle se fait par l'association des métaux comme le mercure, le cadmium, le plomb, le zinc, l'argent et le cuivre avec des protéines de haute affinité pour les ions métalliques de type métallothionéines (Bruins *et al.*, 2000; Blindauer *et al.*, 2001) (Figure I.5).

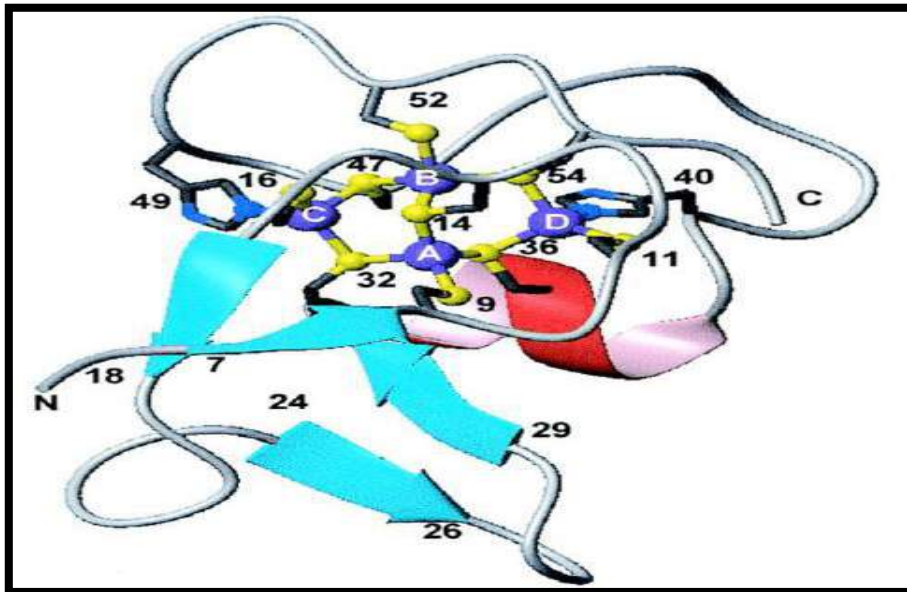


Figure I.5 : Structure RMN de la métallothionéine bactérienne Zn₄SmtA (Blindauer, 2001).

On a comme exemple la Méthallothionéine (MT), elle appartient à la famille des protéines intracellulaires, leur poids moléculaire est < 7000 Da. Elle est très riche en cystéine et possède la capacité de se lier à des métaux en particulier ceux qui régulent l'homéostasie des métaux essentiels (Latendre, 2009). La fonction la plus importante de la MT est de réguler les concentrations intracellulaires de certains métaux tels que le cuivre et le zinc. La liaison covalente des métaux avec les groupements thiols des MT est dynamique parce que les métaux prisonniers peuvent être libérés à tout moment. Les MT assurent un rôle de protection contre les éléments métalliques en limitant leur accessibilité à d'autres sites cellulaires participant de cette manière à la détoxification cellulaire (Nezengue, 2008).

Très peu de métallothionéines ont, à ce jour, été décrites chez des bactéries d'origine marine. Une métallothionéine est utilisée par la protéobactérie marine *Marinobacter* sp. Pour détoxifier le cadmium (Ivanova *et al.*, 2002) et cette protéine est codée par le gène *smtA* chez une cyanobactérie du genre *Synechococcus* (Ji and Silver, 1995).

II.5.2.2. La séquestration extracellulaire

La séquestration extracellulaire correspond à deux processus cellulaires, la biosorption et la minéralisation biologique. La biosorption se produit par l'interaction des métaux avec les groupements anioniques de la paroi cellulaire (groupements thiol, hydroxyle, carboxyl, sulfonate, amine, amide, phosphonate) ou par association à des substances polymériques extracellulaires (polysaccharides, protéines, acides nucléiques ou acides gras) (Scott and Palmer,

1988, 1990). La biominéralisation fonctionne en formant des cristaux qui vont s'adsorber de façon non spécifique sur la paroi cellulaire. Les substances polymériques extracellulaires (EPS) constituent une barrière protectrice hautement hydratée qui joue un rôle dans la survie des bactéries puisqu'elle permet de tamponner les variations physicochimiques du milieu naturel (Harrah *et al.*, 2006). Elles assurent des fonctions variées telle que la lutte contre la dessiccation, les substances hydrophobes toxiques, la résistance aux antibiotiques, la capture des minéraux essentiels et des nutriments et la biosorption des métaux (Comte *et al.*, 2008; De Philippis *et al.*, 2011).

Les EPS représentent les constituants majoritaires de la matrice des biofilms et jouent un rôle dans la fusion des cellules entre elles et dans l'adhérence des microorganismes sur une surface biotique ou abiotique. Les EPS de bactéries marines ont été largement isolées et caractérisées pour leur propriétés chélatrices des métaux lourds (Geesey *et al.*, 1992; Bhaskar and Bhosle, 2005). Les EPS produites par les bactéries marines possèdent une charge nette négative supérieure à celle de bactéries non-marines car elles contiennent plus d'acides uroniques (20-50%) représentés par les acides D-glucuroniques et D-galacturoniques (Kennedy and Sutherland, 1987; Ford *et al.*, 1991).

II.5. 3. La conversion enzymatique

La conversion par des enzymes oxydo-réductrices et métal-spécifiques consiste à transformer un cation métallique en un élément de niveau d'oxydation moins toxique ou sous une forme soluble qui peut être efficacement éliminée par la cellule. En effet, pour éviter la réoxydation des composés métalliques réduits, les métaux doivent pouvoir diffuser à l'extérieur de la cellule grâce à un système d'efflux (Wakatsuki, 1995).

II.5.4. Les systèmes d'efflux

Le transport membranaire est le principal système de résistance bactérienne aux métaux lourds. L'accumulation des cations métalliques peut être diminuée par l'intermédiaire de systèmes d'efflux des ions au travers des membranes cellulaires. Cette extrusion active fait intervenir des transporteurs qui ont une importante spécificité pour les ions métalliques qu'ils transportent via des sites de reconnaissance de haute affinité (Blériot *et al.*, 2014).

Deux systèmes de transport actif ont été décrits chez les bactéries à Gram-négatif : Les transporteurs primaires couplés à l'hydrolyse de l'ATP (transporteurs ABC, ATPase de type P) et des transporteurs secondaires soumis au gradient chimio-osmotique (protéines RND,CDF) (Nies and Silver, 1995).

Résistance au mercure

Les ions mercuriques sont extrêmement toxiques pour les bactéries à cause de leurs interactions avec les groupes thiol (-SH) des protéines. Peut-être le meilleur système étudié de résistance au mercure est codé par des gènes de l'opéron *mer*. Dans ce système, le mercure est transporté dans la cellule par l'intermédiaire de la protéine de transport MerT, et détoxifier par réduction au mercure élémentaire volatil relativement non-toxique par une réductase mercurique intracellulaire (MerA) (Lloyd et Lovley, 2001).

Un mécanisme complexe de résistance, bien conservé chez les bactéries et codé en majorité par des gènes portés par des éléments génétiques mobiles (figure I.6) consiste en la captation des ions mercure Hg(II) via la protéine périplasmique (MerP) et leur transport dans la cellule par la protéine MerT qui forme un canal dans la membrane interne (Monchy, 2007).

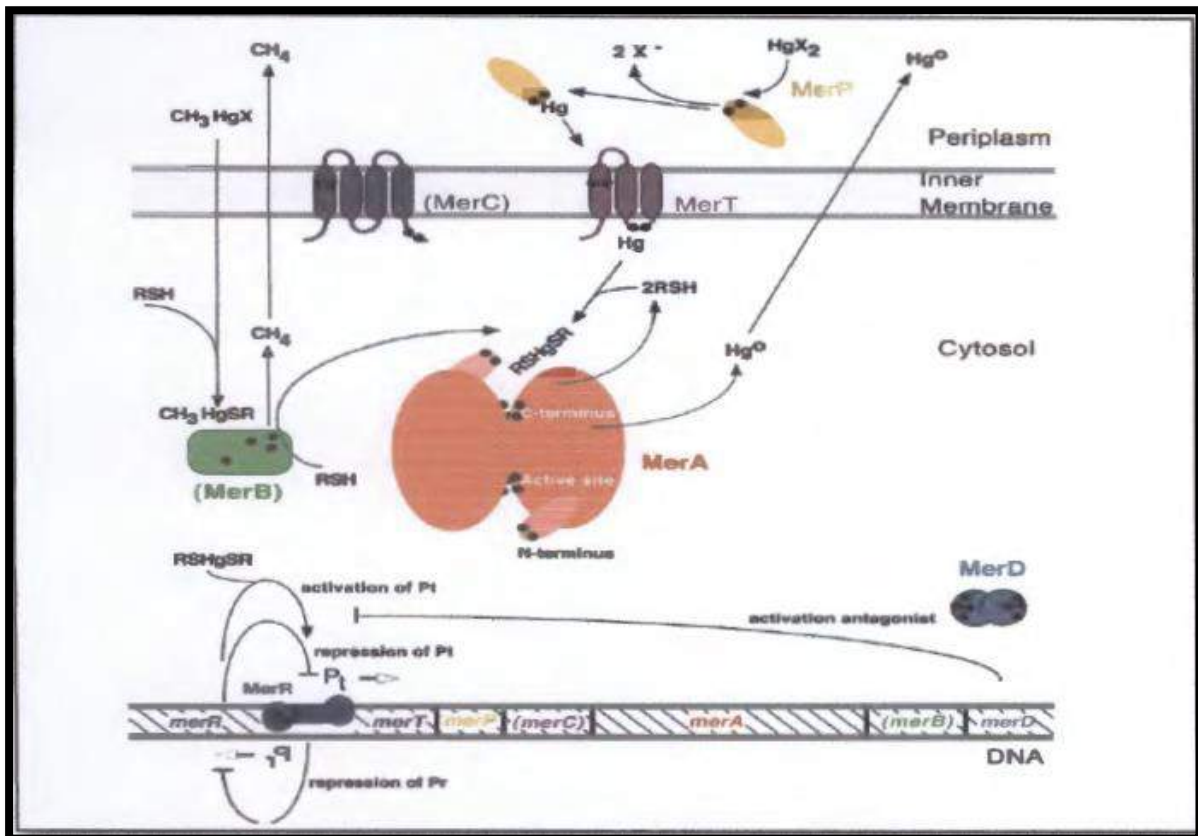


Figure I.6. Mécanismes de résistance au mercure (Barkay *et al.*, 2003).

Résistance au cuivre

Le cuivre est employé par des cellules en petite quantité en enzymes cellulaires (par exemple, oxydase de cytochrome c) et parce que il est tellement largement répandu dans les mines,

l'industrie, et l'agriculture, les niveaux élevés du cuivre peuvent exister dans quelques environnements. Pour cela, les bactéries ont développé plusieurs types de mécanismes pour résister à la toxicité due aux concentrations de cuivre élevées (Spain et Alm, 2003).

Les ions cuivre sont notamment impliqués dans les activités d'oxydoréduction enzymatique. C'est pour cette raison, que le transport et la résistance aux ions cuivre ont été largement étudiés, en particulier chez *E. coli* (Brown et al., 1992) (Figure I.7).

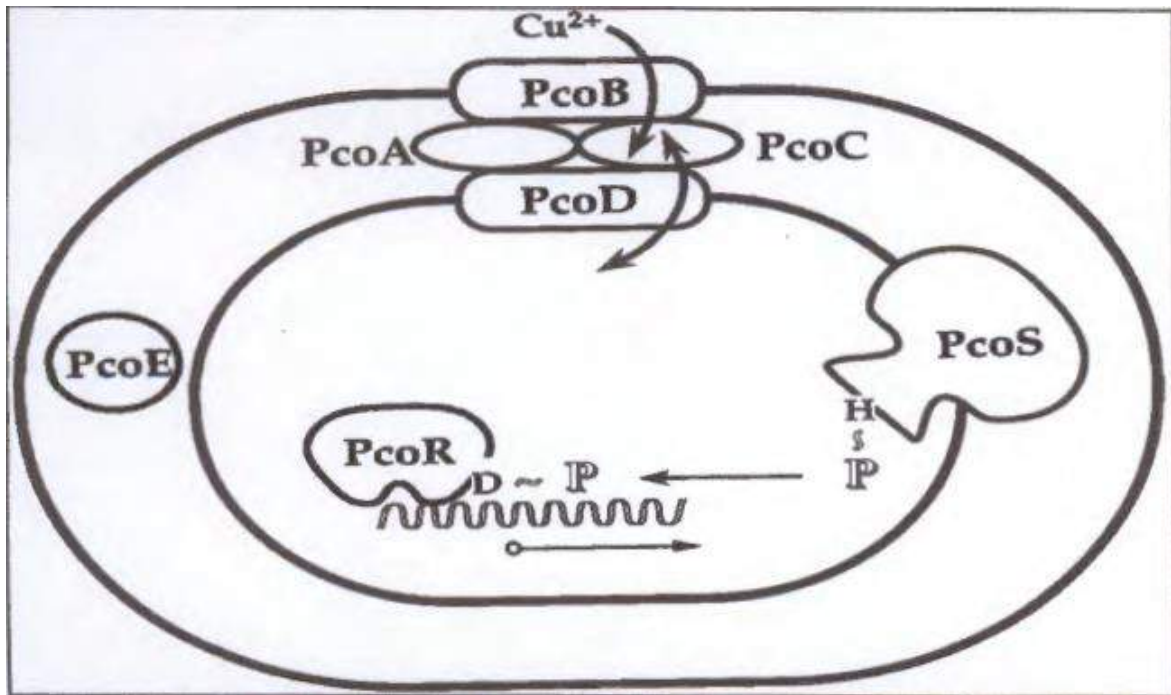


Figure I.7. Résistance au cuivre chez *E. coli* (Silver, 1998).

Résistance au zinc

Les cellules bactériennes accumulent le zinc par un mécanisme rapide et non spécifique de prise et on le trouve normalement dans des concentrations plus élevées (mais est moins toxique) que d'autres métaux lourds. La prise des ions de zinc est généralement couplée à celle du magnésium, et les deux ions peuvent être transportés par les mécanismes similaires dans les bactéries (Spain et Alm, 2003).

Deux mécanismes généraux d'efflux sont responsables de la résistance bactérienne au zinc :

Le premier est un efflux du type ATPase qui transporte les ions de zinc à travers la membrane cytoplasmique par énergie de l'hydrolyse d'ATP (Nies, 1999).

L'autre mécanisme impliqué dans l'efflux de zinc est un système de RND transporteur qui transporte le zinc à travers la paroi des cellules (pas simplement la membrane) des bactéries Gram négatives et est actionné par un gradient de protons et pas un ATP (Spain et Alm, 2003).

Résistance au cadmium

Le cadmium est un métal non-essentiel pouvant être toxique, et ceci même à faible concentrations. Ce métal entre dans la bactérie à travers des systèmes de transport d'ion divalents, tels que les transporteurs du Mn^{2+} et du Mg^{2+} . L'efflux du Cd^{2+} est effectué par des ATPases chez les bactéries à Gram positif et par une pompe à efflux ou un transporteur CDF (Cation Diffusion Facilitator) chez les bactéries à Gram négatif, telles que *Pseudomonas* (Boufligha *et al.*, 2013).

III. La bioremédiation par les microorganismes:

Les bactéries sont capables de réduire, oxyder, séquestrer, volatiliser les polluants. L'exploitation de leurs extraordinaires capacités métaboliques permet d'envisager leur utilisation dans des procédés efficaces et peu coûteux de traitement biologique des eaux ou sols contaminés, en particulier par des métaux traces. Elle concerne notamment l'Al, le Cr, le Mn, le Zn, le Pb, le Cu, le Ni, l'As, le Sn, le Cd, le Ti, l'Hg, etc. (Bauvais, 2015).

Contrairement aux composés organiques, les métaux ne peuvent pas être dégradés. La dépollution des sols implique des processus qui visent à réduire leur biodisponibilité (et donc leur toxicité), en évitant leur transfert vers les nappes phréatiques ou les chaînes alimentaires. Pour cela, on peut soit augmenter leur solubilité afin de les extraire du milieu contaminé, soit, au contraire, les immobiliser sur place afin de les confiner. La biodépollution de sols ou d'eaux par les microorganismes est basée sur l'exploitation de leurs capacités à réaliser l'ensemble de ces réactions (BERTHOMIEU *et al.*, 2008).

La bioremédiation utilise les microorganismes, en particulier bactériennes ou fongiques, afin de dégrader des polluants *in situ* ou *ex situ* (Boopathy, 2000). L'isolement de bactéries provenant d'environnements contaminés par les métaux est la première étape vers la création d'outils de bioremédiation (Jones, 1998; Watanabe, 2001). Ces micro-organismes sont naturellement capables de résister aux éléments toxiques auxquels ils ont été exposés. Ils peuvent être utilisés pour décontaminer les métaux et les radionucléides des eaux contaminées, *in situ* ou *ex situ*, en les éliminant ou les immobilisant (Lovley and Coates, 1997). L'investigation de leurs mécanismes moléculaires de résistance permettrait à terme de développer des bactéries transgéniques spécifiques et optimisées pour chaque type de polluants (Vavasseur *et al.*, 2003). Certaines bactéries ont donc pu être modifiées génétiquement afin d'améliorer leur capacité de

liaison, leur tolérance et leur bioaccumulation de métaux par l'expression de métallothionéines hétérologues ou de peptides de liaison aux métaux (Mejáre and Bülow, 2001).

L'immobilisation microbienne se fait *in situ* et utilise la capacité des bactéries à diminuer ou adsorber les métaux *via* les EPS. Cette méthode permet de réduire la solubilité et donc la toxicité des métaux. Les métaux précipités par les bactéries peuvent alors être récupérés par sédimentation ou filtration. La propriété des EPS capables d'adsorber les métaux offre des perspectives prometteuses pour le développement de nouveaux biomatériaux pour la remédiation de zones contaminées. (Bauvais, 2015).

Des phénomènes de biominéralisation en aérobiose ont également été décrits chez *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que chez diverses souches affiliées aux genres *Citrobacter*, *Rahnella*, *Bacillus* et *Arthrobacter*. Chez ces bactéries, la formation intra- ou extracellulaire de précipités minéraux insolubles de phosphate d'uranyle a été observée (POLLMAN *et al.*, 2006).

Dans le cas de *Citrobacter*, la réaction met en jeu une phosphatase acide membranaire qui catalyse la synthèse de phosphate dans le périplasme. Le phosphate se complexe avec le métal, formant des précipités insolubles de NaUO_2PO_4 ou $\text{NH}_4\text{UO}_2\text{PO}_4$. Ces complexes s'accumulent alors en microcristaux à la surface de la cellule selon un processus de nucléation impliquant les lipopolysaccharides (MACASKIE *et al.*, 2000). Chez *Citrobacter*, le phénomène de biominéralisation peut avoir lieu même si les bactéries sont mortes, ce qui permet d'envisager l'utilisation de ces cellules comme pièges à uranium pour la décontamination des solutions aqueuses (RENNINGER *et al.*, 2004).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

Ce travail rentre dans le cadre des activités de recherche de l'équipe microbiologie-biotechnologie et a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de l'ENSSMAL. Il a pour objectif l'évaluation de la résistance aux métaux lourds dans différentes plages et l'isolement et caractérisation de ces bactéries d'intérêt biotechnologiques. L'ensemble des milieux de cultures, réactifs, solutions, instrument et appareillages seront cités au fur et à mesure de leurs utilisations.

II.1. Présentation des stations d'étude

Afin de mieux appréhender les problèmes et nuisances engendrés par la contamination métallique dans le milieu marin, un échantillonnage a été effectuée le 13 mars 2022. Les échantillons sont aseptiquement prélevés au niveau de six sites différents de la côte algéroise d'Est en Ouest. La sélection des stations d'échantillonnage est basée sur leur accessibilité et leur sensibilité aux apports anthropiques. Les sites d'étude sont décrits comme suit :

II.1.1.Plage colonel abbes (Embouchure de oued Mazafrane)

Cette plage se trouve à environ 33Km à l'ouest d'Alger et 36Km à l'est de Tipaza. Le prélèvement a été effectué au niveau de l'embouchure d'oued Mazafrane qui se trouve au niveau de cette plage d'où sa particularité (à environ 5 mètres de l'embouchure). Elle est constituée de sable fin à grossier avec des galets. La baignade est autorisée. (Rekik,2020) (Figure II.1)



Figure II.1: Localisation du site d'étude plage colonel abbes (Embouchure d'oued mazafrane).

II.1.2.Plage Khelloufi :

Elle est située dans la commune de Zeralda à 29Km à l'ouest d'Alger (wilaya d'Alger) ; la plage est constituée de sable fin à grossier et de galets, la longueur de cette plage est de 800m, par endroits . Elle reçoit les déversements d'oued Mazafrane qui se trouve à environ 300 mètres du point de prélèvement. La baignade est autorisée. (Rekik ,2020) (Figure II.2)



Figure II.2: Localisation du site d'étude plage Khelloufi (Zeralda).

II.1.6.Plage Hôtel Riadh (Sidi Fredj) :

C'est la plage privée de l'hôtel Riadh dans la commune de Staoueli à l'ouest d'Alger (wilaya d'Alger).La plage s'étale sur une longueur de 100 mètres et sur un largeur de 30 mètres. Elle est constituée de sable fin, ou la baignade est autorisée. (Rekik, 2020) (Figure II.3)



Figure II.3: Localisation du site d'étude plage Hôtel Riadh (Sidi Fredj)

II.1.3. Plage bateau cassé :

Cette plage est située dans la commune de Bordj EL Kiffan dans la wilaya d'Alger ; elle est de type sableuse et rocheuse, elle s'étale sur une longueur de 575m et sur une largeur de 50.5m où la baignade est autorisée. (Rekik, 2020) (Figure II.4)

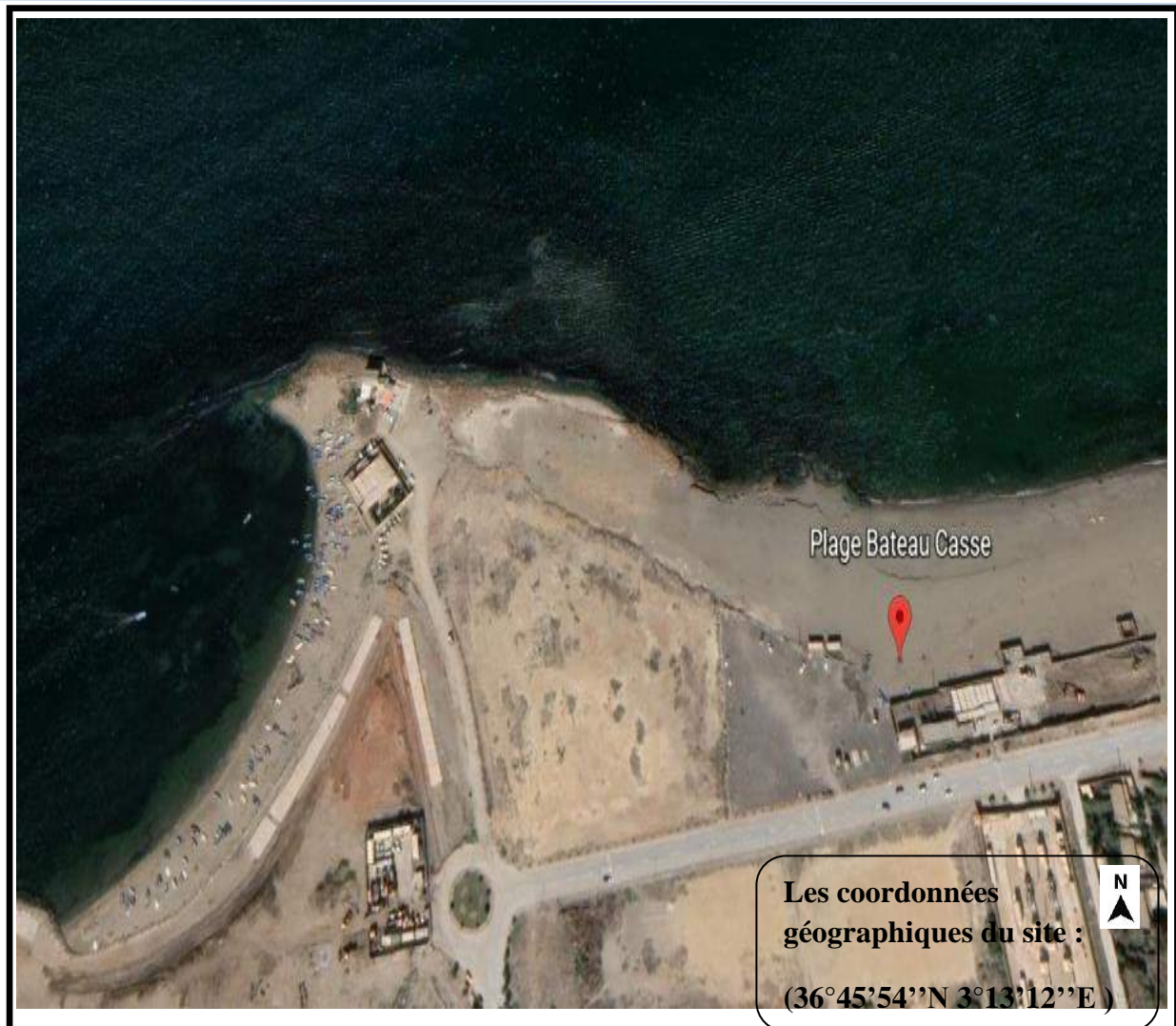


Figure II.4: Localisation du site d'étude plage Bateau cassé.

II.1.4.Plage la sirène :

Cette plage se trouve également dans la commune de Bordj EL Kiffan. Elle est de type sableuse et rocheuse et s'étale sur une superficie de 325m, dans cette plage la baignade y est autorisée.(Rekik.2020)



Figure II.5: Localisation du site d'étude plage la sirène

II.1.5.Plage Flots bleus (Ain Taya)

La plage flots bleus se trouve dans la commune d'Ain Taya à 30Km à l'Est d'Alger. La plage s'étale sur une longueur de 600 mètres et 10mètres de largeur, de type sableuse. La baignade y est autorisée. (Rekik, 2020)

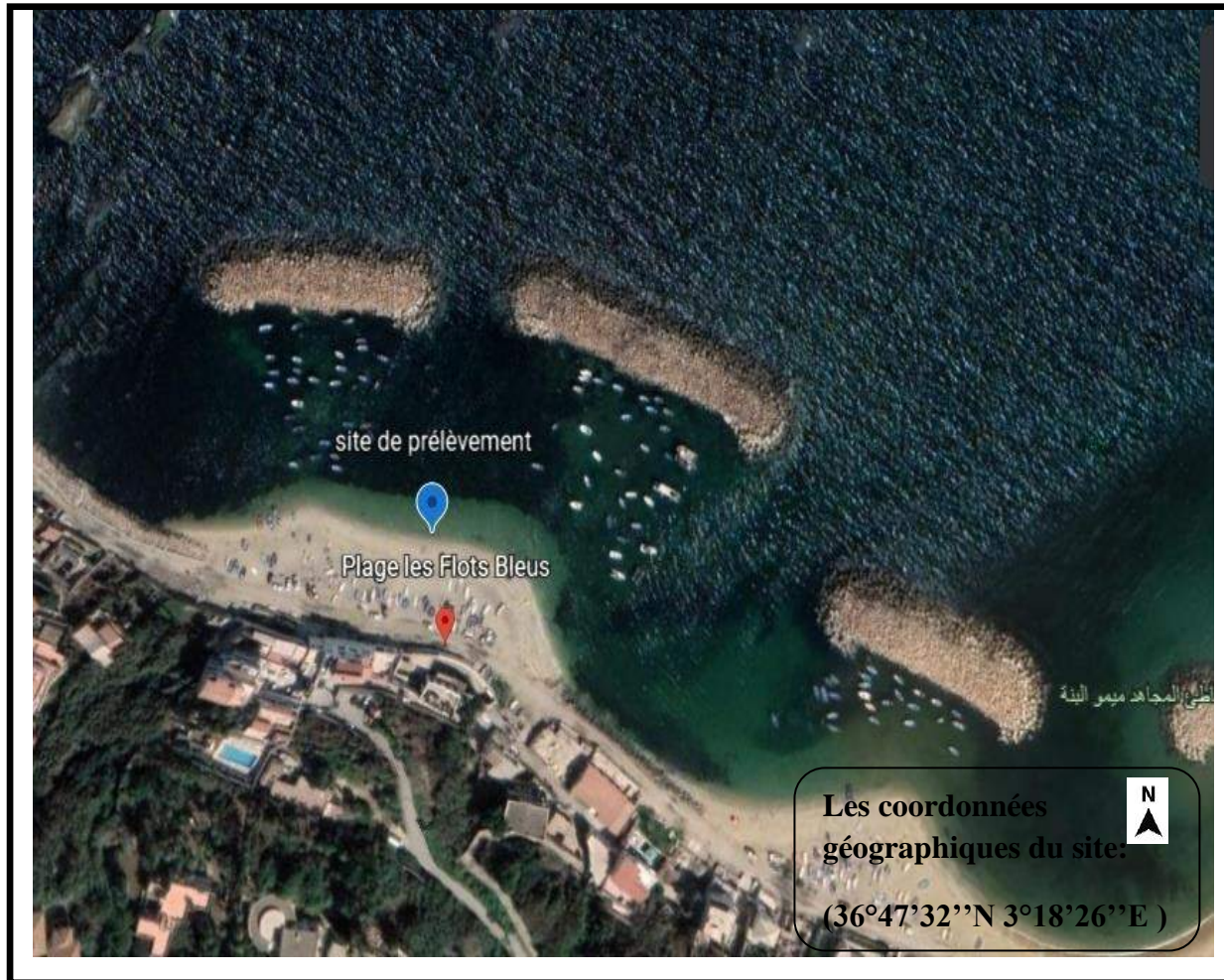


Figure II.6. Localisation du site d'étude plage flots bleus Ain Taya.

II.2 Echantillonnage:

Les bouteilles utilisées pour l'échantillonnage ont été stérilisées dans un autoclave à 120°C pendant 15 minutes (Delarras, 2000). Les flacons ont été immergés à une distance de 50 cm de la surface et à une distance de 1m du bord de mer en évitant la remise en suspension des sédiments (Rodier *et al.*, 2009).

Le flacon a été ouvert sous l'eau et entièrement immergé dans une position verticale inversée, maintenu par le fond retourné, jusqu'à ce que l'ouverture soit légèrement au-dessus du fond et dirigée dans la direction du contre-courant (Rodier, 1996), et refermer sous l'eau afin d'éviter toute contamination.

Les échantillons prélevés sont clairement identifiés. Chaque flacon a porté une étiquette indiquant : le numéro du point de prélèvement, date et heure ; puis tous les échantillons ont été transportés dans une glacière à une température de 4 à 6°C. L'analyse bactériologique a été effectuée dans les 24 heures maximum (Rodier *et al.*, 2009).

II.3 Analyse microbiologique :

L'analyse bactériologique des échantillons prélevés a été réalisée par la méthode d'ensemencement en surface. C'est une technique de dénombrement qui consiste à couler une gélose en boîte de Pétri pré-fournie ou choisie selon la bactérie que l'on étudie.

II.3.1. Préparation des dilutions

Conformément aux normes AFNOR NF VO8-010 et ISO 6887-1, on utilise l'eau distillée pour préparer des dilutions décimales d'eau à analyser.

On met à partir de la solution mère 1ml dans un tube contenant 9ml d'eau distillée stérile, ce tube représente la dilution 10^{-1} , à partir de ce dernier on met 1ml dans un nouveau tube contenant aussi 9ml d'eau distillée, ce tube représente la dilution 10^{-2} et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de toutes les dilutions voulues (Delarras et *al.*, 2010).

II.3.2. Dénombrement de la flore totale bactérienne et les coliformes totaux

A partir de chaque échantillon d'eau brute ou leurs dilution décimale préparée (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}) ; à l'aide d'une pipette Pasteur on a porté aseptiquement 0.1ml et on l'étale, à l'aide d'une pipette râteau, à la surface d'une gélose de Tergitol pour les coliformes totaux et de Mueller Hinton pour la flore totale (figure II.7).

Les boîtes sont incubées couvercle en bas à 37°C pendant 24h à 48h . Après l'incubation les colonies sont dénombrées.

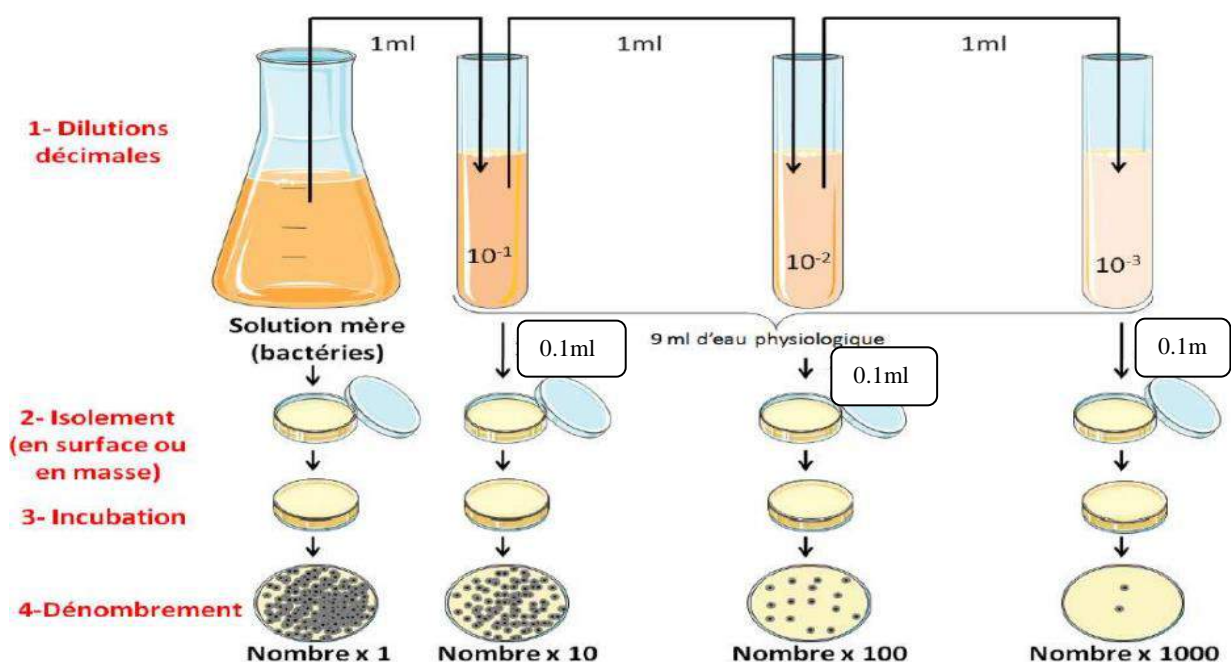


Figure II.7 :dénombrement après culture bactérienne.

- Le calcul du nombre des microorganismes se fait par l'équation suivante :

$$N_{\text{UFC/ml}} = c \cdot 10.1/d$$

N: nombre de microorganismes/ml de suspension.

c : nombre de colonies comptées.

d: dilution de l'échantillon.

II.4. Evaluation de la résistance aux métaux lourds

Dans notre étude nous avons évalué la tolérance ou la résistance des bactéries à quatre métaux lourds choisis selon leurs utilisations, disponibilités, toxicité et importance. Il s'agit du cuivre (Cu), zinc (Zn), cadmium (Cd) et le mercure (Hg) avec des concentrations critiques finales respectives de 400 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml et 50 µg/ml. La préparation des boites à été réalisée selon la méthode de dilution en milieu gélosé (Tergitol pour les coliformes et Mueller Hinton pour la flore totale).

Technique :

- Mettre 2ml de chaque solution métallique dans une boite de Petri.
- Additionner 18 ml du milieu gélosé (Tergitol pour les coliforme et Mueller Hinton pour la flore totale) dans les boites de Pétri pour obtenir les concentrations finales citées ci-dessus.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient on forme de 8 pour permettre à la solution de se mélanger à la gélose utilisée. Laisser solidifier sur la paillasse.
- Des quantités de 0.1ml de chaque échantillon d'eau brute ou leurs dilution décimale préparée (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}) on été étalé sur les boites de géloses préparées.
- Incuber à 37°C pendant 24h-48h.
- Dénombrement des bactéries résistantes à chaque métal.

La détermination des taux de résistance aux métaux lourds est appréciée par l'équation suivante :

$$\% \text{ de résistance} = \frac{\text{Nombre de Bactérie résistance aux métaux lourds}}{\text{Nombre de bactérie en absence de métaux lourds}} \cdot 100$$

II.5. Conservation et mise en place d'une collection de souches résistantes aux métaux lourds

Des colonies bactériennes résistantes aux métaux lourds ont subi une série de repiquage sur milieu contenant les mêmes métaux lourds afin de les purifier et de confirmer leur résistance avant de les conserver. Afin de récupérer des souches jeunes, nous avons réalisé une culture de 24h sur du bouillon nutritif BHIB.

Les cultures pures sont conservées dans des tubes d'Eppendorff contenant du BHIB avec 15 à 20% de glycérol à -20°C.

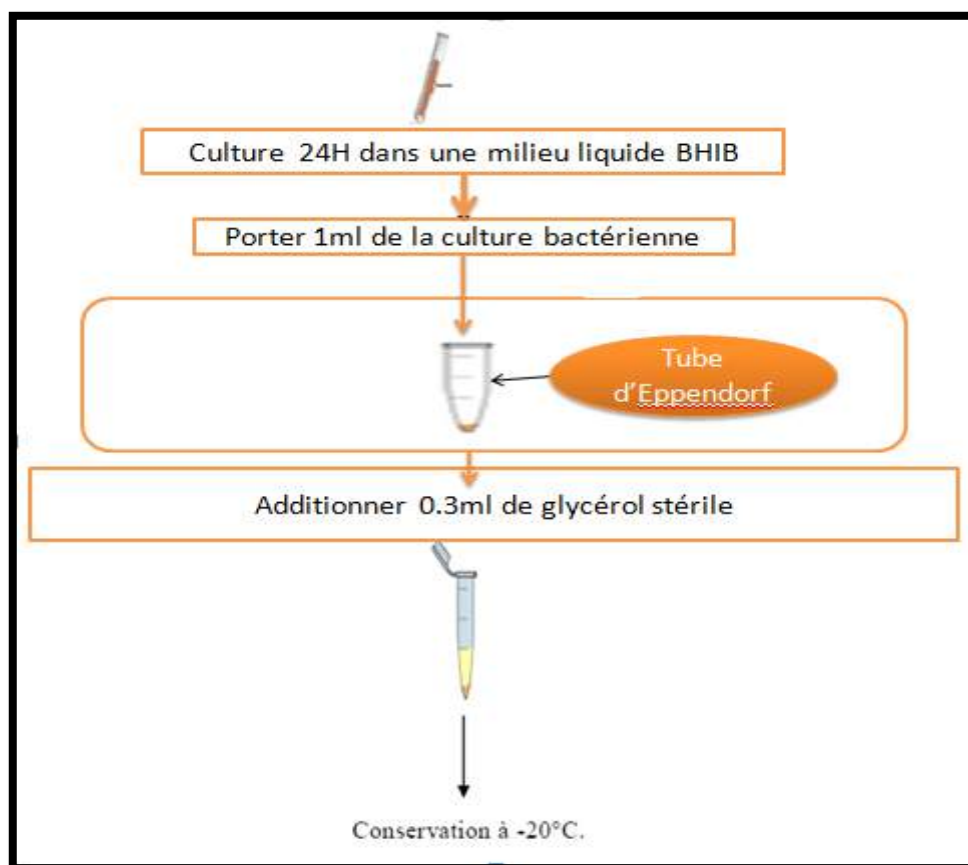


Figure II.8 : schéma explique l'étape de conservation et mise en place d'une collection des souches bactériennes résistantes aux métaux lourds.

II.6. Identification de la flore bactérienne :

Après la conservation des souches pures, nous avons effectué l'identification des espèces bactériennes résistantes. Les étapes de l'identification sont comme suit :

II.6.1. Coloration de GRAM:

La coloration de Gram permet de déterminer deux grands groupes bactériens (Gram positif et Gram négatif), elle nous permet aussi de reconnaître la morphologie et le mode de regroupement des bactéries, les étapes de la méthode sont comme suit (Joffin et Leyral 2006) :

- **Préparation du frottis bactérien** : Prélever une jeune colonie bactérienne (de 18-24h) à identifier et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique à l'aide d'une anse de platine puis la fixer par simple passage sur la flamme du bec bunsen.
 - **Coloration au Violet de Gentiane**: Chaque frottis fixé est coloré pendant une minute au Violet de Gentiane puis laver à l'eau courante.
 - **Mordantage** : Traiter durant une minute à une minute et demi la lame par une solution de Lugol, puis laver à l'eau courante.
 - **Décoloration**: Faire couler l'alcool durant 10 secondes sur la lame puis laver immédiatement à l'eau courante. À ce stade les cellules à Gram négatif seront incolores, les cellules à Gram positif restent violettes.
 - **Recoloration**: en rajoutant de la fuchsine pendant 1 min, puis rincer et sécher la lame.
- **Lecture** : Examiner le frottis au microscope optique en ajoutant une goutte de l'huile à immersion (au Gx100). Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet alors que les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose. Celles-ci diffèrent de part la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane ou de la présence d'une paroi externe. Cette coloration nous permet également de définir la forme et l'arrangement des cellules bactériennes.

II.6.2. Identification biochimique des bacilles à Gram négatif :

Après confirmation du GRAM, les souches à GRAM négatif de forme bacille ou cocobacille ont été identifiées au moyen de galerie API20E. (bioMérieux, Inc. France)

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture.

➤ **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ **Préparation de l'inoculum**

- Faire une suspension bactérienne dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie pure prélevée sur un milieu gélosé.

➤ **Inoculation de la galerie**

- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

➤ **Lecture**

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés, sauf certaines sont révélées par l'addition de Réactifs :

- **VP** : Ajouter les réactifs (VP I + VP II) puis attendre 10 min, une couleur rose rouge indique une réaction positive.
- **TDA** : Ajouter le réactif TDA, une couleur marron foncé indique une réaction positive.
- **IND** : Ajouter le réactif de Kovacs puis attendre 2 min, un anneau rouge apparaît indique une réaction positive.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (**annexe 01**), Les tests sont regroupés en groupe de 3 et une valeur de 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification (Guiraud, 2003).

Le code numérique obtenu permet d'identifier la souche étudié en se référant au logiciel d'identification **identification.xls**.

II.6.3. Identification des cocci à GRAM positif

Les cocci à Gram positif comprennent *Staphylococcus* (catalase-positif), qui développe des grappes, et *Streptococcus* (catalase-négatif), qui se développe en chaînes. Les staphylocoques se

subdivisent en outre en espèces à coagulase positive (*S. aureus*) et à coagulase négative (*S. epidermidis* et *S. saprophyticus*). (Sizar, Unakal, 2022).

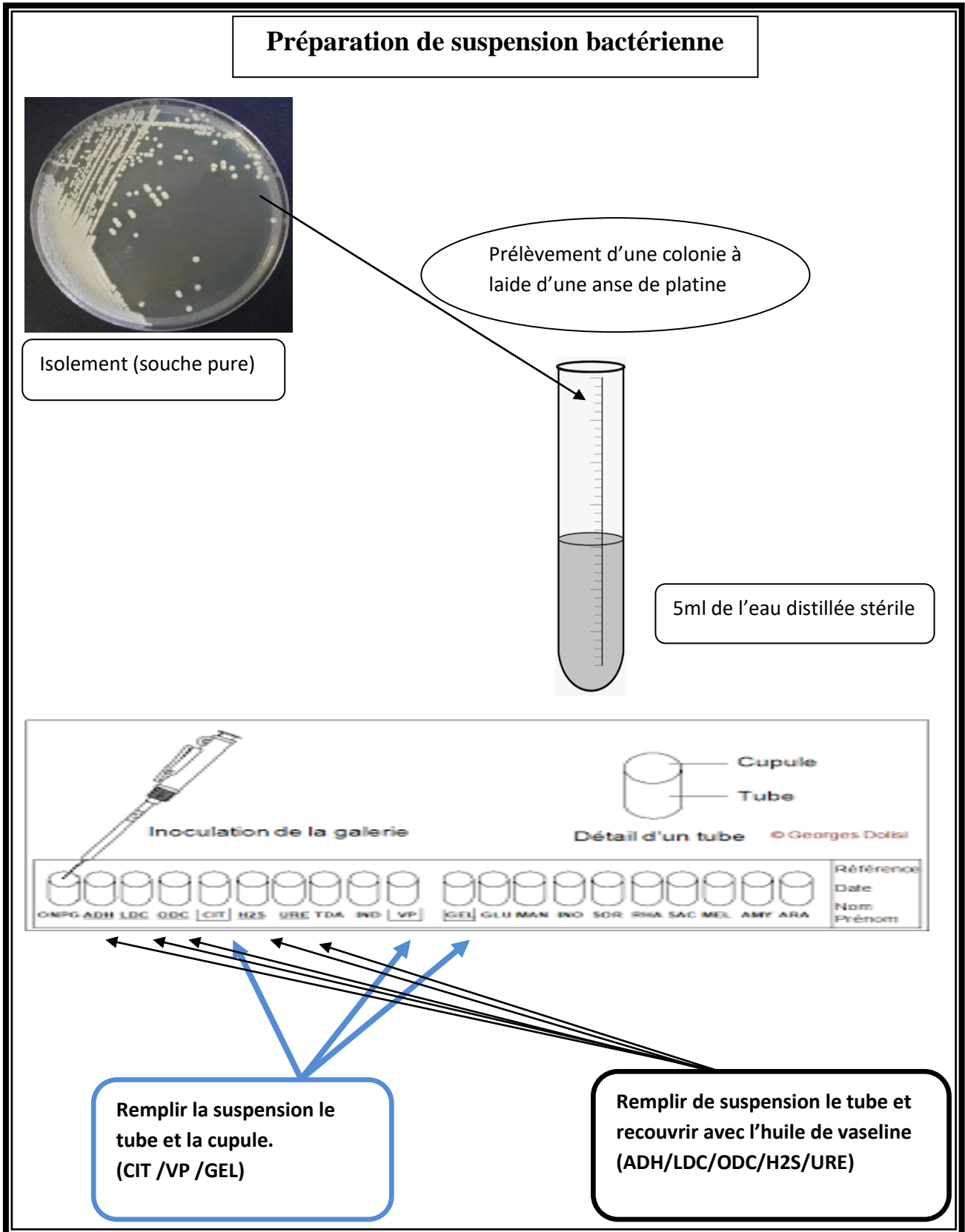


Figure II.9: Identification biochimique Galerie API20E.

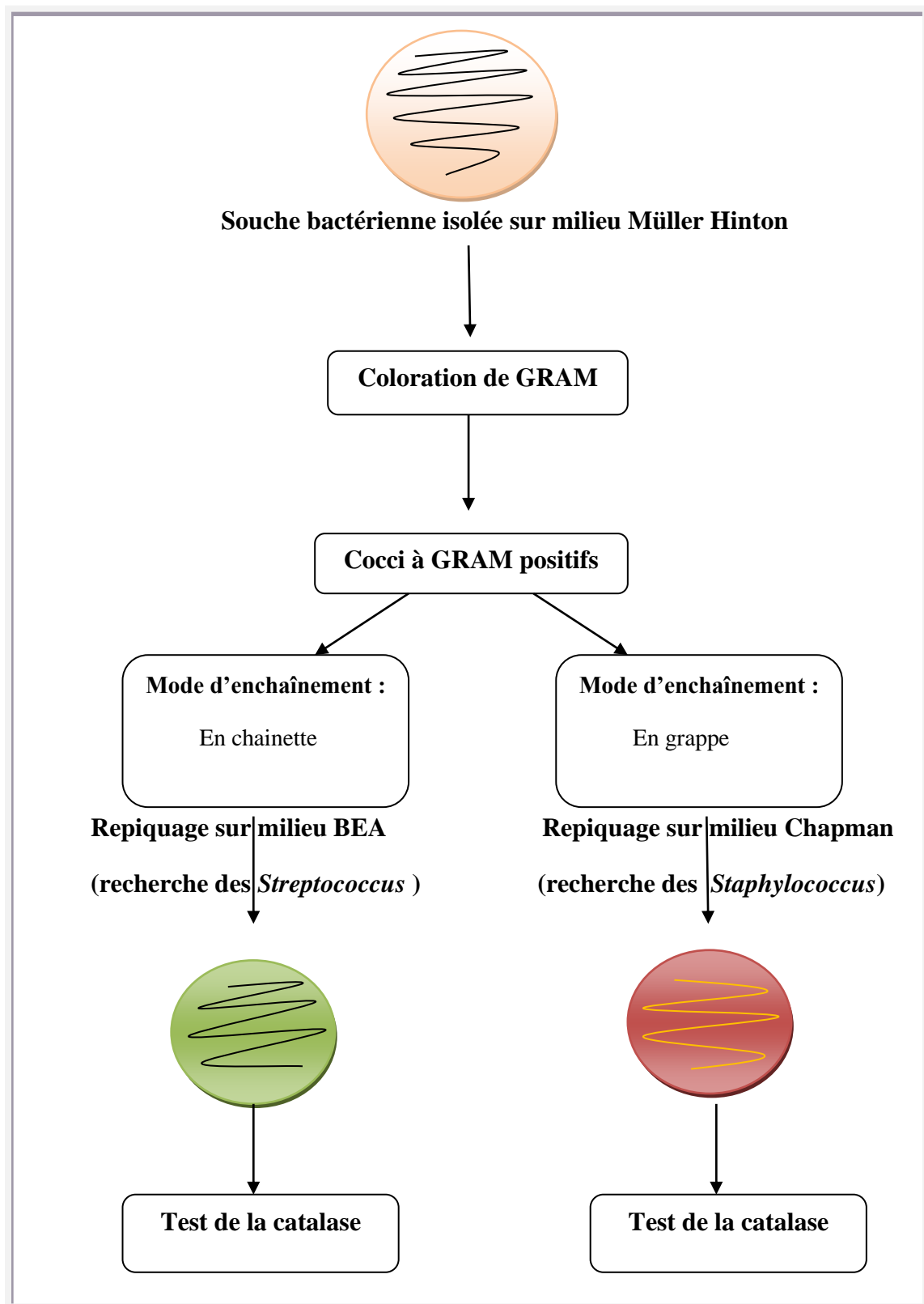


Figure II.10:Schéma représente les étapes d'identification des cocci à GRAM positifs.

II.6.3.1. Recherche des staphylocoques sur Chapman:

Après coloration de GRAM, les souches cocci à Gram positifs avec mode d'enchaînement en amas, ont été isolées sur la gélose Chapman qui est un milieu sélectifs pour les staphylocoques et confirmer par un test de la catalase.

II.6.3.2. Recherche des streptocoques:

Pour les cocci à GRAM positif avec mode d'enchaînement en chaînette, un repiquage sur milieu BEA à été réalisé. Après, repiquage sur gélose BEA les colonies entourées d'un halot noir ont subi un test de catalase.

II.6.3.3. Test de la catalase :**• Principe :**

Cette enzyme empêche en effet l'accumulation d' H_2O_2 et le dégrade selon la réaction suivante :



- **Remarque** : Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram positif (Delarras, 2003).

• Technique

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.
- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien.
- Surveiller l'apparition d'un dégagement d'oxygène sous forme de bulles gazeuses (Delarras, 2003).

• Lecture

- Dégagement immédiat de bulles gazeuses: le test catalase est positif.
- Pas de dégagement de bulles gazeuses: le test catalase est négatif (Delarras, 2003).

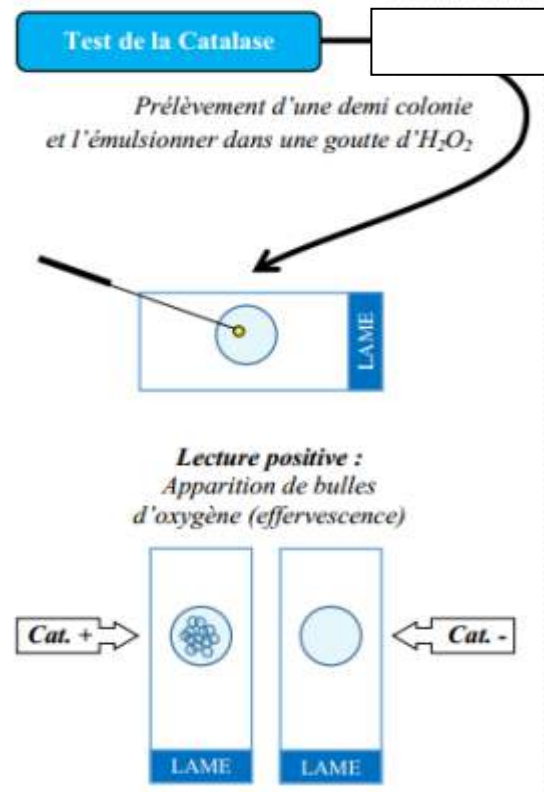


Figure II.11 : Test biochimique de confirmation (test de la catalase).

II.7. Détermination du profil de résistance aux métaux lourds des souches bactériennes isolées:

On prépare des cultures bactériennes pour chaque souche bactérienne isolée résistante aux métaux lourds dans le milieu liquide BHIB avec incubation à 37°C pendant 24h. Un inoculum de 2µl (dot) est déposé à la surface de boîtes de MH additionnées de métaux lourds à des concentrations critiques : cuivre (400 µg/ml) ; cadmium(200 µg/ml) ; zinc (400 µg/ml) ; mercure (50 µg/ml) puis incubé à 37°C pendant 24h.

La lecture est faite après 24h, une croissance bactérienne indique la résistance de cette souche au métal utilisé.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Evaluation de la qualité bactériologique des échantillons :

Les échantillons d'eau ont subi une analyse de certains paramètres bactériologiques à savoir la flore totale et les coliformes totaux afin d'apprécier la qualité de ces échantillons (Figure III.1).

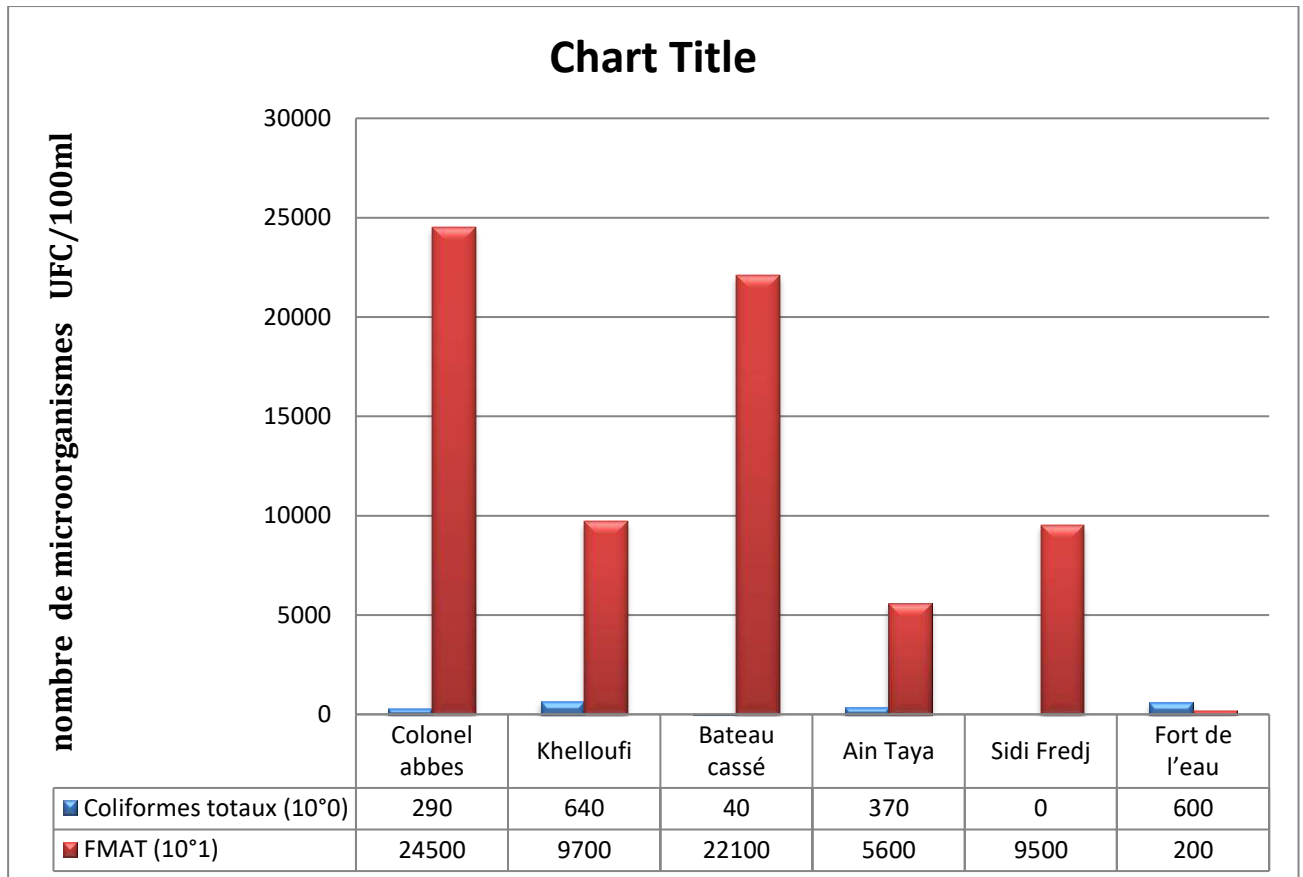


Figure III.1 : résultats de recherche des coliformes totaux et la FMAT.

III.1.1. Résultats de recherche de la flore mésophile aérobies totale :

La flore totale aérobie, encore appelée flore aérobie mésophile, est l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en présence d'oxygène à une température située entre 25° et 40°C, cette microflore peut comprendre des microorganismes pathogènes pour l'homme. (FERHI et FLIH ,2019).

La flore mésophile aérobie totale (FMAT) est utilisée comme un indicateur de la charge globale. Elle représente l'ensemble des microorganismes autochtones et allochtones capables de se multiplier à une température qui varie entre 22 et 40 °C (RODIER *et al.*, 2009).

On remarque d'après la figure III.1, que la charge bactérienne est très élevée dans tous les stations sauf la station fort de l'eau, jusqu'a atteindre 24500UFC/ml au niveau de plage colonel abbes et cela peut expliquer par le diversement d'oued Mazafrane directement en mer.

La distribution de la pollution microbienne au niveau des zones d'études doit être mise en relation avec la localisation des émissaires des rejets des eaux usées urbaines et industrielles à ce niveau. Elle doit être également mise en relation aux variations au cours de la journée du débit des eaux usées déversées dans la baie et des courants marins.

III.1.2. Résultats de recherche des coliformes totaux:

Les coliformes sont des bâtonnets, aérobies ou anaérobies facultatifs, GRAM- non sporulant permettant l'hydrolyse du lactose à 35°C+/-2 (OMS ,1979).les coliformes regroupent les genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*. (RODIER et al 1996 ; JOLY et REYNAUD ,2003)

La recherche et le dénombrement de l'ensemble des coliformes (coliformes totaux) est essentiel pour la vérification de l'efficacité d'un traitement désinfectant et est d'un intérêt nuancé pour déceler une contamination d'origine fécale (RODIER et al, 1996).

D'après les résultats de dénombrements de l'ensemble des CT, on remarque la charge bactérienne la plus élevée est constatée dans la plage fort de l'eau elle est de 600UFC/100ml d'eau, donc les eaux dont les concentrations comprises entre la valeur guide : 500UFC/100ml et la valeur limite : 1000UFC/100ml (J.O.R.A.D.P ,1993) sont de qualité acceptable et doivent faire l'objet d'une surveillance continue, au delà ces eaux sont contaminées.

Les concentrations moyennes en coliformes totaux sont moins importantes que celles de la FMAT et cela est très logique car les coliformes font partie de la FMAT.

III.2.Prévalence de la résistance aux métaux lourds chez la flore totale:

III.2.1. chez la flore totale:

Les résultats obtenus pour les pourcentages de résistance aux métaux lourds chez la flore mésophile aérobie totale sont représentés dans la figure III.2.

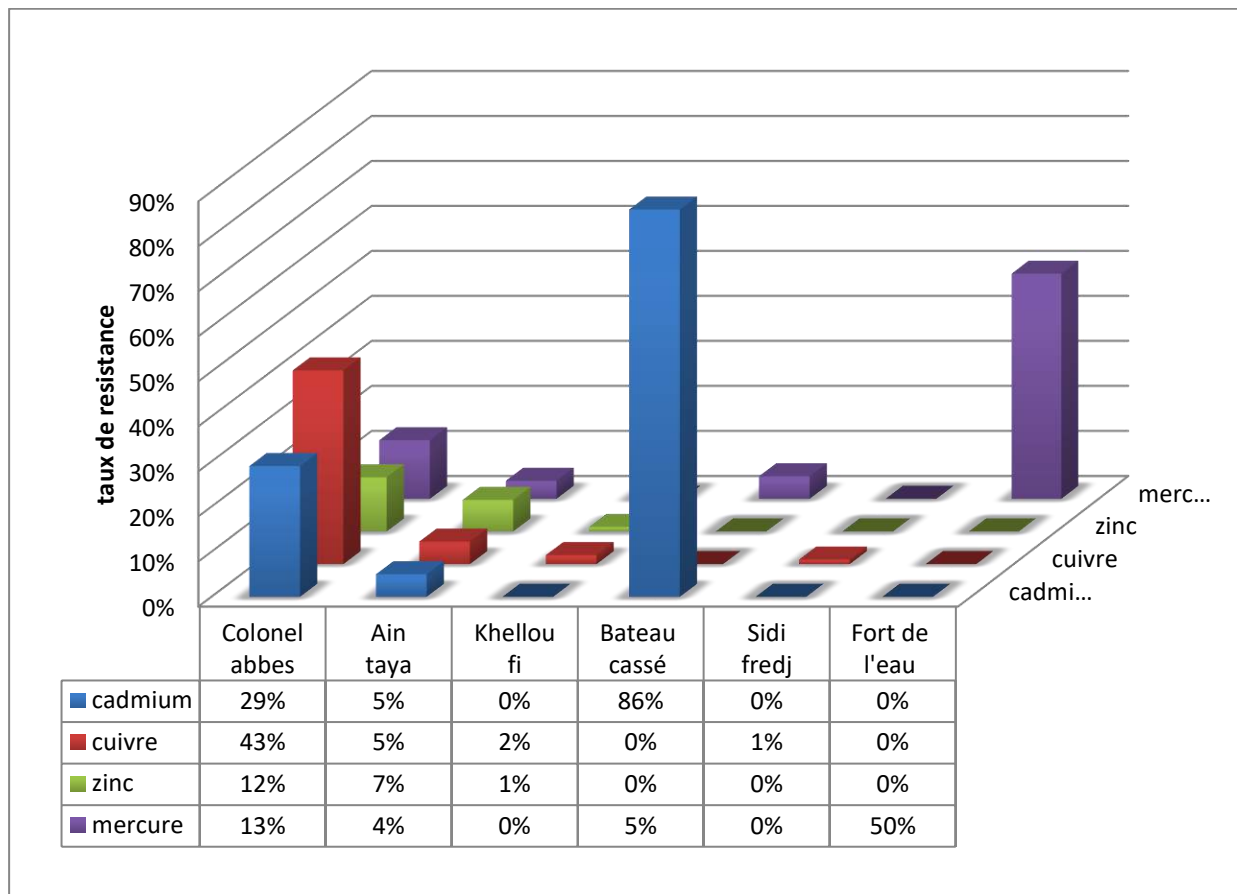


Figure III.2: la résistance aux métaux lourds chez la flore totale.

Les résultats de résistance aux métaux lourds chez la flore totale après très hétérogènes à partir d’un site à un autre.

- Au niveau de la plage colonel abbes (embouchure d’oued Mazafrane), les résultats obtenus ont indiqué la présence de bactéries résistante aux métaux lourds avec des taux de 43% pour le cuivre, 29% pour le cadmium, 13% pour le mercure et à 12% pour le zinc. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la station est soumise aux différents rejets urbains et industriels qui déversent dans oued Mazafrane et à une disponibilité des métaux lourds dans ces rejets.

Oued Mazafrane est considéré comme le plus grand et le plus important oued dans la wilaya de Tipaza. Il draine les eaux d’une grande partie d’Oued Chiffa, Oued Djer et Oued Bouroumi (w. de Blida). Il prend la direction Sud-ouest à Nord-Est. (Sellami et Zitouni . 2020).

- Base centrale logistique de Béni Mered (rejets de cyanure, chrome, nickel et cuivre)

Office nationale des aliments de bétail d’Attatba.

- Unité Satti Koléa (utilisation de 44 colorants et 22 produits chimiques).
- Unités de tissage.

- Finissage et teinturerie utilisant des produits chimiques tels que les colorants à base de métaux (chrome, cadmium,.....etc.)

Les rejets domestiques et les rejets des complexes touristiques, du moment que la baie fait partie de la zone d'expansion touristique (ZET), qui s'accroissent en période estivale, en plus des nombreuses unités industrielles. Tous ces rejets sont évacués directement dans le milieu marin sans aucun traitement préalable. (Sellami et Zitouni, 2020)

- Dans la station Bateau cassé, les résultats ont démontré la présence des bactéries résistantes au cadmium avec un taux de résistance 86% et à 5 % pour le mercure, qui sont deux métaux extrêmement toxiques. Par contre, on a observé une absence de tolérance pour le cuivre et le zinc. Cette zone peut être influencée par les apports anthropiques d'Oued El Harrach qui est environ à 15 Km et aussi ceux d'oued El Hamiz. En effet, plusieurs études ont montré l'existence de métaux lourds générés par plusieurs entreprise métallurgique, au alentour de l'embouchure de Oued El Harrach (FRIOUI.2017).

- Au niveau de fort de l'eau, une résistance au mercure atteinte jusqu'à 50%, ce pourcentage pourrait s'expliquer les effluents de la production de batteries à base de mercure, câbles et interrupteurs électriques, sans oublier la présence naturelle de ce métal dans la croûte terrestre. Cette situation pourrait favoriser une telle fréquence en raison du temps alloué aux processus de transfert de plasmides de résistance aux métaux lourds entre les souches (Ünaldi Coral *et al.*, 2005; Dionisio *et al.*, 2002 ; Ghosh *et al.*, 2000).

- A propos de la plage Ain Taya, on a remarqué une résistance à tous les métaux testés mais à des faibles pourcentages, 5% pour le cuivre ,5% pour le cadmium, 7% pour le zinc et 4% pour le mercure. Les résultats obtenus peuvent être expliqués par les apports des rejets industriels de la zone industrielle de Reghaia et Rouïba et à la nature de la région qui est ouverte.

- Au niveau de Sidi Fredj on a observé des résultats presque nuls, ce qui peut être dû à l'absence de ces métaux au niveau de cette station qui est caractérisé par un manque d'activités industrielles.

- La présence ou l'absence des souches bactériennes résistantes seraient de bons indicateurs biologiques de contamination métallique et permettraient ainsi de caractériser l'état des écosystèmes marins. (Bauvais, 2015). En effet, nous résultats corroborent les résultats de plusieurs études qui supposent que les apports anthropiques influencent les aux de résistance microbienne aux agents antimicrobiens (Alouache et al, 2011 ; Mudryk *et al* 2010)

III.2.2. chez les coliformes:

Les résultats obtenus pour les pourcentages de résistance aux métaux lourds chez les coliformes totaux sont représentés dans la figure III.3.

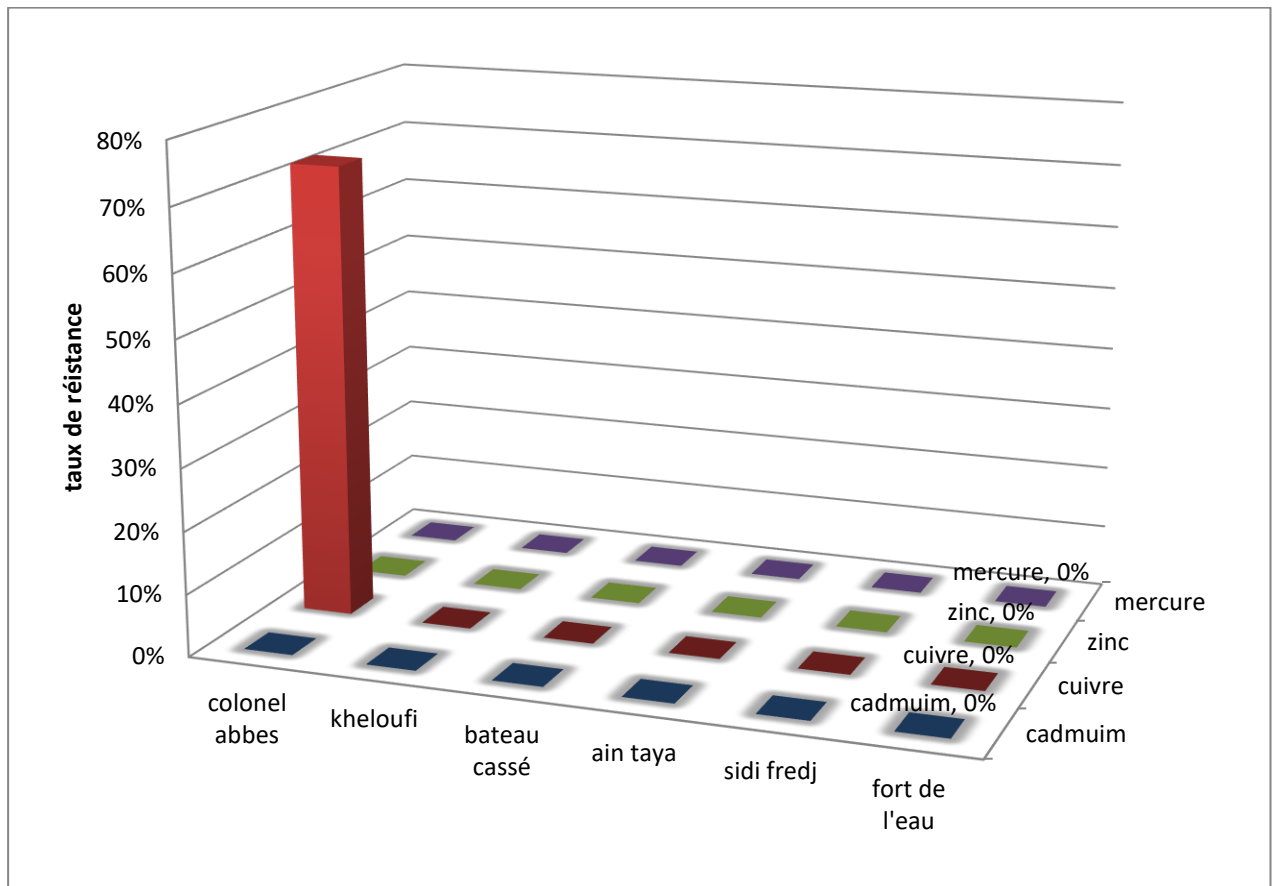


Figure III.3: la résistance aux métaux lourds chez les coliformes totaux.

Dans le cas des CT, une absence de tolérance (0% taux de résistance) est constatée dans toutes les stations pour tous les métaux lourds étudiés, à l'exception du cuivre dans la station colonel abbes où un taux de résistance de 72% a été observé.

III.3. Identification de la flore bactérienne résistante aux métaux lourds:

35 souches résistantes aux différents métaux lourds ont été isolées, purifiées et ont subi plusieurs tests en vue de leur identification. Les résultats ont été comme suit :

III.3.1. La coloration GRAM :

La coloration différentielle de Gram réalisée pour 35 souches résistantes a montré la présence majoritaire de bactéries à Gram négatif (30/35). Elles se présentent sous la forme de bacille, et des cocco-bacilles de différentes tailles.

Seule 5 souches ont été trouvées à Gram positif et se présentent sous forme de cocci ; regroupées en chaînette ou en grappe de raisins. Les résultats sont représentés dans le tableau n°01.

Tableau01 : Résultats de la coloration de Gram pour 35 souches résistantes aux métaux lourds isolées des différentes plages.

Station	Métal	souche	Coloration de GRAM
Plage colonel abbes (C)	Mercure	CH1	Bacille à Gram-
		CH2	Bacille à Gram-
		CH3	Bacille à Gram-
		CH5	Cocci à Gram +
	Zinc	CZ1	Bacille à Gram-
	Cadmium	CC3	Bacille à Gram-
		CC4	Cocci à Gram-
		CC6	Cocci à Gram+
		CC7	Cocci à Gram+
		CC5e	Cocci à Gram-
		CC11	Cocci à Gram-
		CC15	Cocco-bacille à Gram-
		CC18	Cocco-bacille à Gram-
		CC19	Cocco-bacille à Gram+
	Cuivre	CCu8	Bacille à Gram-
		CCu12	Bacille à Gram-
		CCu10	Bacille à Gram-
		CCu13	Bacille à Gram-
		CCu6	Bacille à Gram-
		CCu2	Bacille à Gram-
		CCu11	Bacille à Gram-
		CCu9	Bacille à Gram-
	Plage Ain Taya (A)	Zinc	AZ2
AZ5			Bacille à Gram-
AZ6			Cocci à Gram-
AZ8			Cocco-bacille à Gram-

Plage Khelloufi (K)	Cuivre	ACu1	Bacille à Gram-
		ACu13	Bacille à Gram-
	Cadmium	BC13	Cocco-bacille à Gram-
		BC1	Bacille à Gram-
		BC5	Cocci à Gram-
		BC17	Bacille à Gram+
		BC5	Cocci à Gram-
	Cuivre	BCu3	Bacille à Gram-
	Cuivre	KCu10	Bacille à Gram-

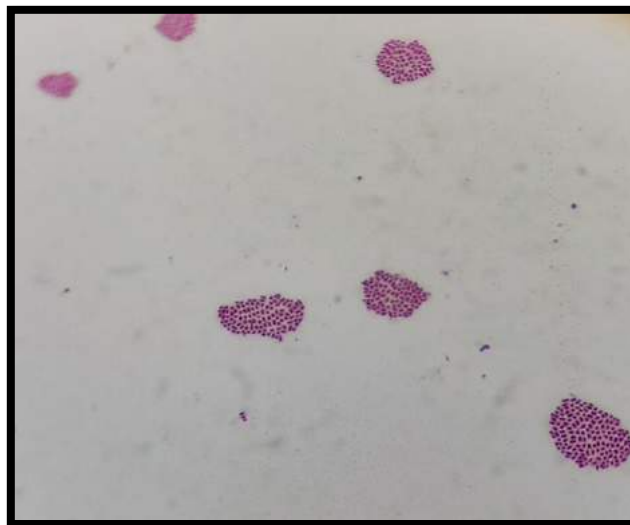


Figure III.4 : Illustration de bactéries à GRAM négatif de forme cocco-bacille (GX100)

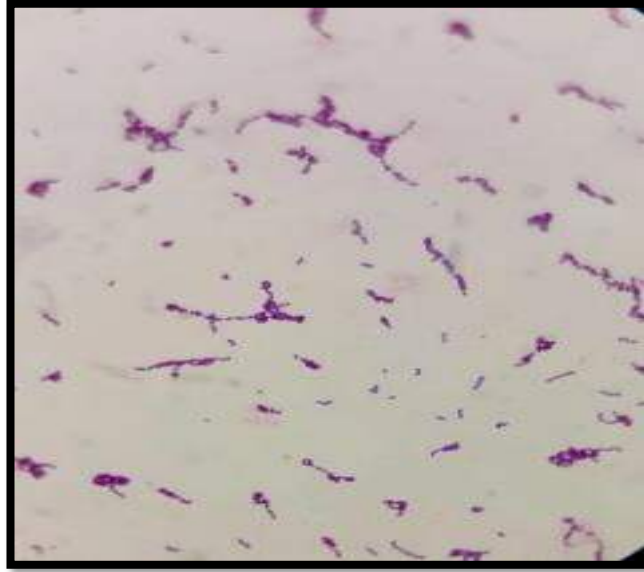


Figure III.5 : Illustration de cocci à GRAM positif en chainette (GX100)

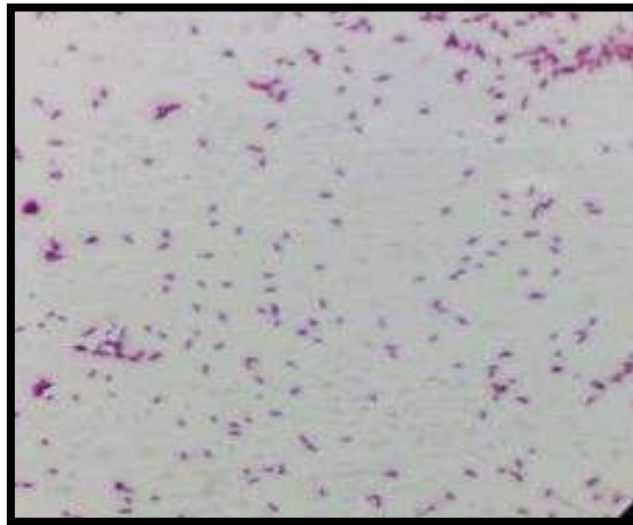


Figure III.6 : illustration de bacille à Gram négatif de (GX100)

D'après nos résultats obtenus, on a remarqué que la plupart des bactéries résistantes aux métaux lourds testés sont des Gram négatifs. Ces résultats sont confirmés par ceux de Duxbury (1981) ; qui a signalé que généralement les espèces à Gram négatifs isolées du sol semblent être plus tolérantes que les Gram-positifs et Pennanen *et al.*, (1996) qui ont constaté que les bactéries à Gram négatif sont plus répandues que les bactéries à Gram positif dans les sols contaminés par les métaux lourds.

Aussi , Hassen et al (1998) ont indiqué dans leurs études sur la résistance aux métaux lourds des bactéries isolées de différents environnements naturellement pollués, que les bactéries résistantes étaient des bactéries à Gram négatifs.

III.3.2. Identification biochimique :

Afin d'identifier quelques espèces des bacilles à GRAM négatif résistants aux métaux lourds, le système de galerie API20E a été utilisé (Tableau02, figure III.7 ; III.8 ; III.9). Les résultats nous ont permis d'assigner quelques souches aux espèces suivantes :

Tableau02: Résultats de l'identification de 17 souches à Gram négatif résistantes aux métaux lourds par la galerie API20E.

Code	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Identification
CCu11	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	<i>Pseudomonas luteola</i>
Acu 1	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i>
Ccu 13	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Stenophomonas maltophilia</i>
Bc13	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter sakazakii</i>
Ccu 6	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>Aeromonas hydrophila gr1</i>
Bcu 3	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
Ccu 12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>Klebseilla pneumoniae ssp ozaenae</i>
AZ 8	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	<i>Aeromonas hydrophila gr.1</i>
CZ 1	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	<i>Psodomonas luteola</i>
CH1	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
KCU 10	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	<i>Vibrio fluvialis</i>

BC 1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+/-	+	+	+	+	+	(sor+): <i>Enterob-acter cloacea</i> (sor-) <i>Enterobacter sakazakii</i>
CC 15	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
CC 18	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i>
CCu 8	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i>
CCu 2	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CCu 7	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Vibrio fluvialis</i>



Figure III.7 : profil biochimique de l'espèce *Stenophomonas maltophilia*.



Figure III.8 : Profil biochimique de l'espèce *Escherichia coli*.



Figure III.9 : Profil biochimique de l'espèce *Pseudomonas luteola*.

Concernant les souches à Gram positif sur les 17, nous avons retrouvé 3 cocci à Gram + avec un agencement en grappes de raison ce qui nous a orienté vers le genre *staphylococcus*. Cette identification a été confirmée par l'utilisation du milieu chapman et la catalase : colonie jaune catalase positif ce qui augure de la présence de *S. aureus*.

Pour les cocci en chaînette un passage sur BEA a été réalisé pour confirmer l'utilisation de l'esculine et la résistance à la bile ainsi que le test de la catalase qui était négatif : c'est bactéries appartiennent au genre *Enterococcus*.

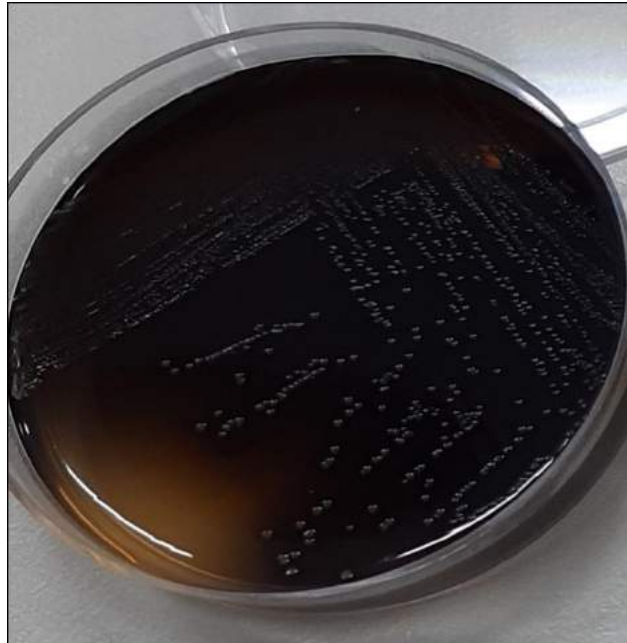


Figure III.10 : colonies entourées d'un halot noir sur milieu BEA.

La répartition des souches selon le site et le métal est montré dans la figure III.10 et le tableau n°03.

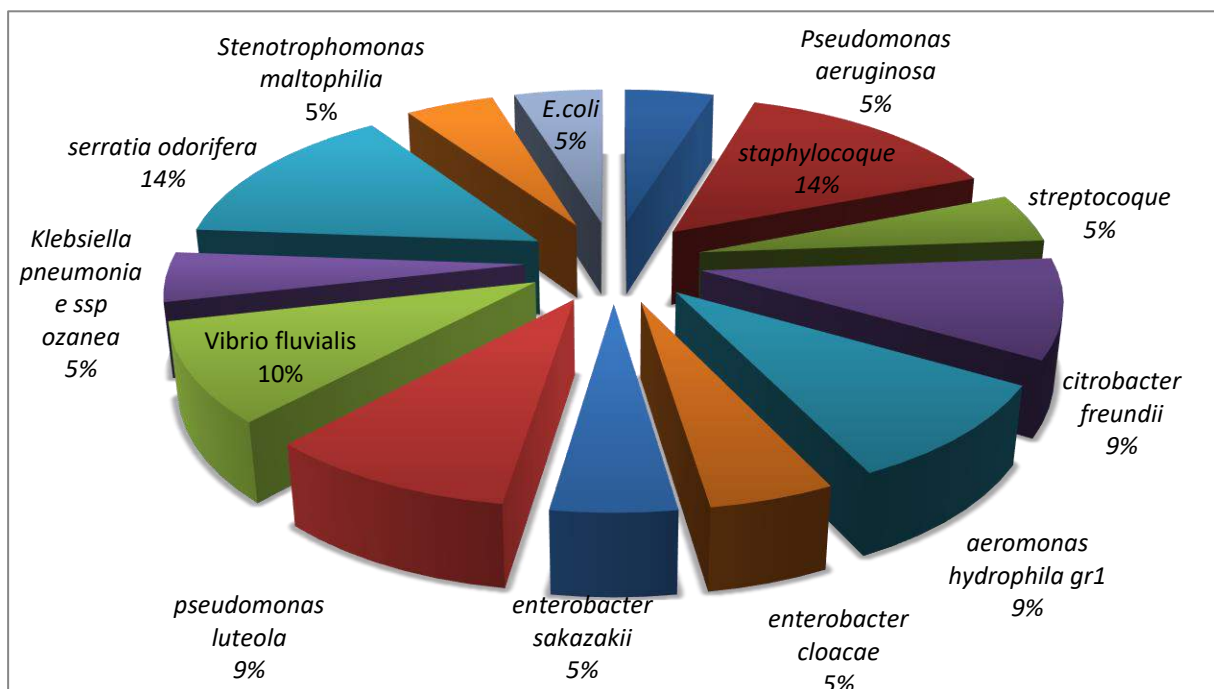


Figure III.11 : Répartition des souches identifiées résistantes aux métaux lourds (n=21).

Tableau03 : résultats de la répartition des souches résistantes aux métaux lourds (n=21)

	Kheloufi	Colonel abbes	Ain taya	Bateau cassé	
Cuivre (n= 10)					
<i>Serratia odorifera</i>		1	1		
<i>Vibrio fluvialis</i>	1		1		
<i>Citrobacter freundii</i>				1	
<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozanea</i>		1			
<i>Pseudomonas luteola</i>		1			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1			
<i>Aeromonas hydrophila gr1</i>		1			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		1			
Cadmium (n=7)					
<i>Citrobacter freundii</i>		1			
<i>Serratia odorifera</i>		1			
<i>Enterobacter cloacae</i>				1	
<i>Enterobacter sakazakii</i>				1	
<i>Staphylocoque</i>		3			
Mercure (n=2)					
<i>Escherichia coli</i>		1			
<i>Streptocoque</i>		1			
Zinc (n=2)					
<i>Pseudomonas luteola</i>		1			
<i>Aeromonas hydrophila gr1</i>			1		

A partir des résultats obtenus, nous avons isolé dans le cas du cuivre une souche de chaque espèce : *Serratia odorifera* , *Vibrio fluvialis* , *Citrobacter freundii* , *Pseudomonas luteola* ,des *Pseudomonas aeruginosa* et des *Klebsiella pneumoniae ssp ozanea* et *Aeromonas hydrophila gr1*.

Cependant dans le cas de la résistance au cadmium, nous avons isolé 3 souches des *Staphylococaceae*, une souche d'*Enterobacter sakazakii*, de *Citrobacter freundii*, et de *Serratia odorifera*.

Conformément à nos résultats, CHITOUR et SOUILAH, (2018) elles ont trouvé que toutes les souches des entérobactéries isolées des eaux de surface de la région de GUELMA tolèrent à 100% les concentrations allant de 12.5 à 400µg/ml de métal (cuivre et cadmium). Ainsi, que l'espèce *Klebsiella pneumoniae* présente un taux de tolérance très élevées (plus de 99% vis-à-vis du cuivre et plus de 98% vis-à-vis du cadmium) en ce qui concerne les concentrations 800 à 1600µg/ml.

Pour les *staphylococcus*, elles ont enregistré que le taux de résistance est à 100% vis-à-vis des concentrations en allant de 12.5 à 400µg/ml du cadmium.

El Solh et Ehrlich (1982) ont isolé un plasmide de 3,2-kb (piP983), spécifiant la résistance au Cd, à partir d'une souche de *S. aureus*. Dans une autre étude, Tynecka *et al.*, (1981) ont conclu que la résistance de *S. aureus* 17810R au Cd²⁺ semble être causée par un système d'efflux de Cd²⁺ codé par un plasmide.

Les quatre protéines structurales déterminant la résistance de cuivre chez *Pseudomonas* ont été caractérisées et sont la protéine intérieure CopD de membrane, la protéine externe CopB de membrane, et deux protéines de cuivre bleues périplasmique CopA et CopC (Silver, 1998).

SHILPI *et al.* (2003) ont rapporté que des isolats de la famille des *Pseudomonaceae* résistantes à l'aluminium et au cuivre, isolés d'un sol contaminé, ont montré un niveau de tolérance de 0,711274 mg/ml et de 1,007142 mg/ml respectivement.

Chez *Pseudomonas* et *E. coli*, l'accumulation de l'excès de cuivre dans l'espace périplasmique protège les bactéries de ce métal (SILVER et GANGYONG, 1994).

Ce type de résistance est assuré par le système *Pco/Cop* chez *E. coli/Pseudomonas Syringae* respectivement. Il est gouverné par quatre gènes structuraux nommés *PcoA/CopA*, *PcoB/CopB*, *PcoC/CopC* et *PcoD/CopD* et deux gènes régulateurs *PcoR/Cop R* et *PcoS/copS* (BROWN *et al.*, 1995).

Par contre, les résultats de Benkhaoua *et al* (2017); El Houchet et Haridi. (2017) ont montré que le cuivre a un effet bactéricide sur la totalité des *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae*.

Le *Stenophomonas maltophilia* a montré une résistance à 5 métaux Hg²⁺, Cr⁶⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ et Cu²⁺. En ce qui concerne la résistance aux métaux phénotypes et génotypes, la résistance au Cu²⁺ était cohérente avec la récupération de *cueR* et *copA*. (Shuhong Zhang ; Guangli Yang et Yali Jiang . 2022)

Dans le cas de zinc, nous avons isolé une souche de *Pseudomonas luteola*, et d'*Aeromonas hydrophila* gr1.

Le mécanisme impliqué dans l'efflux de zinc est un système de RND transporteur qui transporte le zinc à travers la paroi des cellules (pas simplement la membrane) des bactéries à Gram négatif et est actionné par un gradient de protons (Spain et Alm, 2003).

Pour les souches résistantes au mercure identifiées, nous avons trouvé deux souches. Une de *Streptococcus*, et l'autre d'*Escherichia coli*. Harnett and Gyles (1984) ont rapporté que pour les souches d'*E. coli*, la résistance au mercure est véhiculée par un même plasmide qui code pour la multirésistance aux antibiotiques.

Un taux de résistance au mercure de 58,6% a été observé par Nakahara et al. (1977) chez des souches d'*E.coli* d'origine clinique.

Les streptocoques, y'a pas d'étude qui confirme la résistance des streptocoques au mercure, donc ça peut être une résistance acquise.

Dans l'étude de QUINCAMPOIX et MAINARDI .(2001), sur les mécanismes de résistance des cocci à Gram positif, ils ont démontré que ces derniers possèdent une flexibilité de leur génome qui permet des échanges génétiques intra- ou inter-espèces.

III.3.Résultats du test de résistance aux métaux lourds des souches bactériennes isolées :

Les résultats obtenus pour les profils de résistance aux métaux lourds des souches bactériennes isolées sont représentés dans le tableau 04.

Tableau04 : les résultats de profil de résistance des souches isolées.

Plage	Souches	Profil
Colonel abbes (7 profils)	CCU 9 / CCU8 <i>Serratia odorifera</i> / CCU13 <i>Stenophomonas maltophilia</i> / CCU11 <i>Pseudomonas luteola</i> / CC 11/ CC 2	Cu-cd (n=6)
	CH1 <i>Escherichia coli</i> / CH 4	Cu-hg (n=1)
	CCU6 <i>Aeromonas hydrophila gr1</i> / CH5 <i>Streptococcus</i> / CH3 <i>Photobactrium damsela</i>	Cu-cd-hg (n=3)
	CH 2 <i>Ochrobactrum anthropi</i>	Cu-zn-hg (n=1)
	CC7 <i>S.aureus</i> / CC6 <i>S.aureus</i> / CC 3/ CC 19/ CC18 <i>Serratia odorifera</i>	Cu-zn-cd (n=5)
	CZ1 <i>Pseudomonas luteola</i>	Zn-cd-hg (n=1)
	CCU12 <i>Klebseilla pneumoniae ssp ozaenae</i> / CCU2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / CC4 <i>S.aureus</i> / CC15 <i>Citrobacter freundii</i>	Cu-zn-cd-hg (n=4)
Khelloufi (02 profils)	KCU 4	Cu-hg (n=2)
	KCU10 <i>Vibrio fluvialis</i>	Cu-zn-hg (n=1)
Ain Taya (5 profils)	AZ 4	Zn (n=1)
	ACU7 <i>Vibrio fluvialis</i> / AZ 5/ AZ 7/ AZ8 <i>Aeromonas hydrophila gr1</i>	Cu-zn (n=4)
	AZ 6	Cu-zn-cd (n=1)
	AZ 3	Cu-zn-hg (n=1)
	AZ 2/ ACU1 <i>Serratia odorifera</i>	Cu-zn-cd-hg (n=2)
Bateau cassé (5 profils)	BC9/ BC 10/ BC 12	Zn-cd (n=3)
	BC1 <i>Enterobacter sakazakii</i> / <i>Enterobacter cloacea</i>	Cu-cd (n=1)
	BC 5/ BC 16/ BC 17/ BC 8	Cu-Zn-cd (n=4)
	BCU3 <i>Citrobacter freundii</i>	Cu-zn-hg (n=1)
	BC13 <i>Enterobacter sakazakii</i> / BC 5 ^e /BC 14	Cu-Zn-cd-hg (n=3)

Les phénotypes de résistance les plus fréquents ont concernés le Cu-Zn-Cd-Hg (n=9), Cu-Cd, (n=6) et à moindre degré Cu-Zn-Hg (n=4) avec des variations en fonction des stations, le phénotype Cu-Zn-Cd (n=10) étant le plus répandu parmi les phénotypes de résistance testés. La résistance au cadmium a été le plus souvent associée à celle du cuivre.

En tenant compte de la mono-résistance, le phénotype de résistance Zn a été trouvé seulement au niveau de la station de Ain Taya. Dans le cas de la multi-résistance, le phénotypes de résistance Cu-Hg est plus marquée au niveau de la station Colonel Abbès par rapport a la station Khelloufi, le phénotype Cu-Zn était plus répandu au niveau de la station de Ain Taya . De même, le phénotype de résistance Cd-Zn a été rencontré seulement au niveau de la station bateau cassé. Pour le phénotype de résistance au Cd-Zn-Hg à été trouvé que dans la station de colonel abbès. De plus, une fréquence plus élevée des phénotypes de résistance au Cu-Zn-Cd-Hg et au Cu-Cd ont été rencontrés sur des souches de la station Colonel Abbès en comparaison à celle des autres stations.

Mono-résistance et multiple-résistance aux métaux lourds

Exceptés quelques cas, la multi-résistance à 3 métaux a été plus répandue que la mono ou la multi-résistance à 2 ou à 4 métaux (**Tab 04**).

La proportion de germes sensibles a été moins fréquente dans la station Bateau Cassé versus la station Colonel Abbès. La mono-résistance a été trouvée parmi les souches isolées de la station Ain Taya seulement.

Par ailleurs, la résistance à 2 métaux a été exprimée dans une proportion élevée pour les souches de la station Colonel Abbès que celles des stations Khelloufi, Ain Taya et bateau cassé. Ainsi, la résistance à 3 métaux a été nettement plus fréquente pour les souches de la station colonel Abbès.

Au niveau des stations d'embouchure d'Oued Mazafrane et Bateau Cassé, la fréquence élevée de phénotype de résistance au Cu-Zn-Cd-Hg est probablement liée:

- i) À la composition des genres et des espèces bactériennes de ces stations.
- ii) Aux conditions spécifiques de ces stations favorisant la prolifération de ces phénotypes.

La surveillance des phénotypes de résistance aux métaux lourds ou la détermination des CMI des métaux lourds chez des souches bactériennes, constitue une méthode de choix pour détecter une contamination par les métaux lourds ou pour discriminer entre les cours d'eau polluées ou non par les métaux lourds.(Habi, 2018)

La présence de phénotypes bactériens testés pour être résistants aux métaux pourrait refléter l'accumulation des métaux par leur hôte et donc la contamination du milieu (Kaluzhnaya and Itskovich, 2014).

Ainsi, le pourcentage élevé de souches porteuses du phénotype Cu-Zn-Cd observé à la station Colonel Abbas pourrait expliquer la pollution par ces métaux induite par les effluents de la manufacture de batteries à base de zinc, cuivre et cadmium. Des études antérieures avaient notées que les fréquences élevées de germes résistants aux métaux rencontrés dans un site donné sont liées aux pressions sélectives exercées par les métaux lourds au sein de ce site (Al-Jebouri, 1985; Zelibor *et al.*, 1987b; Diaz-Ravina *et al.*, 1994).

Dans l'étude de Silver S et Phung LT (1996) sur les plasmides bactériens codant des systèmes de résistance aux ions métalliques toxiques, ont conclu qu'il y a une pompe d'efflux chimiosmotique Czc (Cd²⁺, Zn²⁺ et CO₂⁺) à trois composants des bactéries du sol se compose de protéines de la membrane interne (CzcA), de la membrane externe (CzcC) et de la membrane (CzcB) qui ensemble transportent les cations du cytoplasme à travers l'espace périplasmique, vers l'extérieur de la cellule.

De plus, le cadmium est principalement un sous-produit de l'industrie métallurgique du zinc, sous forme de sulfure de cadmium en association avec du sulfure de zinc, mais également du cuivre ou des phosphates, aussi bien lors de l'extraction, que de la fonte ou du raffinage de ces minerais. (Andujar *et al.*, 2010)

Le faible pourcentage de résistance au Cd constaté sur des souches de la station Khelloufi et Ain Taya en comparaison aux autres stations, pourrait être en rapport avec la salinité des sols, et interfère probablement avec le mécanisme d'efflux du cadmium (Silver and Walderhaug, 1992).

Parmi, les souches tolérantes identifiées au cours de notre étude, nous avons trouvé des souches tolérantes à 4 métaux lourds (la multi-résistance à 4 métaux) qui sont: *Klebseilla pneumoniae ssp ozaenae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Citrobacter freundii* isolées de la plage Colonel Abbas, *Enterobacter sakazakii* isolées à partir des eaux de Bateau Cassé et *Serratia odorifera* isolée de la plage Ain Taya.

Cette étude a montré que la souche de staphylocoque est une bactéries multi-résistante. Aussi, des études réalisées par Faria *et al.* (2009) et Harakeh *et al.* (2006) rapportent que les souches de staphylocoques isolées des eaux de mer, des eaux usées et des eaux potables sont multi-résistantes aux antibiotiques.

De même, dans l'étude de Chitour et al. (2018) presque la totalité des staphylocoques étudiés ont été résistantes aux cuivre et cadmium.

Concernant, *Pseudomonas aeruginosa*, PERRON *et al.* (2004) ont montré que la présence de zinc sélectionne des souches de *P. aeruginosa* résistantes à la fois à différents métaux : Zn, Cd et Co et à l'imipénème, antibiotique de la famille des carbapénèmes. Cette double résistance implique le système de régulation à deux composants CzcR/CzcS qui en présence du métal va d'une part, induire l'expression de la pompe à efflux CzcCBA permettant l'efflux du Zn, Cd et Co et d'autre part réprimer l'expression de la porine OprD, responsable notamment de l'entrée de l'imipénème dans la cellule (PERRON *et al.*, 2004).

Caille *et al.* (2007) ont montré que la présence de cuivre avait le même effet sur la résistance à l'imipénème.

Pseudomonas aeruginosa a montré une tolérance maximale aux métaux lourds. Ce résultat est en accord avec ceux de Leedjaru et al. (1996) qui ont rapporté que *Pseudomonas aeruginosa* contient au moins quatre transporteurs d'efflux de zinc ou de cadmium ou de plomb et deux transporteurs chimiosmotiques Cadmium, Zinc et Cobalt (CZC).

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les ions Cu^{2+} sont exportés par un mécanisme impliquant quatre protéines séquestrant le cuivre dans le périplasma. Aussi, Il a été montré que *Pseudomonas aeruginosa* peut lier 100% des ions Cd^{2+} ajouté dans le milieu de culture, à une concentration de 2,5 mg.L⁻¹. (Ferret, 2012).

Muhammad Muktar Namadi *et al* (2016), ils ont montré que la réduction des métaux lourds par chaque isolat bactérien dans les eaux usées de la raffinerie a révélé que *P. aeruginosa* est le meilleur isolat tolérant aux métaux lourds, suivi de *P. vulgaris*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. aureus*. *Pseudomonas aeruginosa* a montré une élimination de 100% du cadmium des eaux usées de la raffinerie.

D'après ces résultats, l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* a un grand intérêt biotechnologique, on peut l'exploiter dans la détoxification ou bien la bioremédiation des eaux ou des sols contaminés par les métaux lourds. Cela est confirmé par Edward Raja Chellaiah (2018) qui a montré que *P. aeruginosa* peut être utilisé comme biosorbant approprié pour l'élimination du cadmium et d'autres métaux lourds de solutions, de déchets contaminés, d'eau et de sol.

Selon Vitri et Giownnetti (2008), il ont rapporté que *Pseudomonas spp.* a la capacité de dégrader les métaux lourds présents dans les effluents industriels. En général, le consortium de culture mixte Consortium (MCC) des cinq bactéries tolérantes aux métaux lourds ont montré la plus grande efficacité pour la réduction des métaux lourds dans les effluents.

La bioremédiation des environnements contaminés par les métaux lourds est un processus prometteur, mais on peut aussi utiliser les gènes présentés chez les bactéries tolérantes responsables de la résistance aux métaux lourds pour la détoxification de ces métaux et avec plus d'efficacité et de spécificité.

Comme l'application de gène mer (mer R) dans la décontamination de mercure. Plusieurs études ont prouvé que le gène mer R présent chez *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *S aureus* a un intérêt dans l'application biotechnologique pour la bioremédiation des environnements contaminés par le mercure. (Summers et Silver, 1978 ; Bahriain et Foster, 1996 ; Silver et Phung, 1996 ; Osborn et al,1997) .

Conclusion

Conclusion

Ce travail a porté sur l'impact de la pollution métallique sur la flore bactérienne aquatique. Il avait pour objectif l'évaluation de cette résistance aux métaux lourds et l'isolement et la caractérisation de certaines bactéries résistantes.

Les résultats obtenus ont permis de dégager les points suivants :

- les résultats de l'analyse de la flore totale ont montré une charge bactérienne très élevée dans tous les stations sauf la plage fort de l'eau. Cependant, Les valeurs de concentrations bactériennes en CT révèlent que les eaux sont de qualité bonne à acceptable.
- Concernant la prévalence de la résistance aux métaux lourds chez la FMAT, une résistance à tous les métaux lourds étudiés dans la plage Ain Taya et aussi dans la plage colonel abbes, mais avec des pourcentage de résistance plus importants, ces taux peuvent être expliquer par la présence de l'embouchure d'Oued Mazafrane et les rejets domestiques et industrielles qui se versent dans ce oued.
- De plus, la résistance au mercure était le plus répandu dans la plupart des stations.
- La plage de sidi fredj est caractérisée par un manque des bactéries tolérantes, ce qui serait dû à l'absence des activités industriels dans cette zone.
- Il est intéressant de noter que les résultats obtenus étaient en accord avec les conclusions qui disent qu'il ya corrélation entre la présence des bactéries résistantes et les apports anthropiques dans les sites d'études.
- Un nombre important des souches multi-résistantes à 3 ou à 4 métaux a été marqué et surtout au niveau de la plage colonel abbes. Des résultats très hétérogènes par rapport aux phénotypes de résistance ont été obtenus mais le phénotype le plus répandu était cu-zn-cd.

Enfin, cette étude a permis d'évaluer l'état de la résistance aux métaux lourds dans les différents sites et d'isoler des souches multi-résistantes aux métaux dans un intérêt biotechnologique à savoir le traitement des rejets industriels et la bioremédiation, comme le *Pseudomonas aeruginosa* qui a été décrit par plusieurs dans la détoxification des milieux contaminés par les métaux lourds.

Conclusion

En Perspectives à ce travail :

- Un suivi de l'évaluation de la résistance aux métaux lourds dans les zones d'études.
- une caractérisation génotypique des mécanismes de résistance aux métaux lourds chez les souches isolées.
- Application de ces souches dans des procédés de traitement des rejets contaminés par les métaux lourds au niveau des usines.
- Application de ces souches dans des sites pollués afin d'évaluer leur potentiel en Bioremédiation.

Références bibliographiques

Abskharon R.N.N., Hassan S.H.A., Gad El-Rab S.M.F. , Shoreit A.A.M. (2008). Heavy Metal Resistant of *E. coli* Isolated from Wastewater Sites in Assiut City, Egypt. *Bull Environ Contam Toxicol.* Vol 81.P.P.309-315.

Al-Jebouri M. M., (1985). A note on antibiotic resistance in the bacterial flora of raw sewage and sewage-polluted River Tigris in Mosul, Iraq. *J. Appl.Bacteriol.*, Vol 58, 401-405pp.

Alouache, S., Kada, M., Messai, Y., Estepa, V., Torres, C., Bakour, R. (2012). Antibiotic resistance and extended-spectrum β -lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes and environments.* Vol 27. N°1, P.P.80-86.

A.Martin Garin , O.Simon (2004). Cadmium 109 et environnement .France.[S, ed].P.23.

Andujar P., Bensefa-colas , L., Descatha, A (2010). Intoxication aiguë et chronique au cadmium. *La Revue de médecine interne.* Vol. 31. N° 2, P.P.107-115.

Arana I., Justo J.L., Muela A., Pocino M., Iriberry J., Barcina I. (1997). Influence of a survival process in a freshwater system upon plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Microbial Ecology.* Vol 31,P.P. 41-49.

Baker .A. J. M. ,Walker .P.L. (1990). Ecophysiology of meta-uptake by tolerant plants. *In: Heavy Metal Tolerance in Plant: Evolutionary Aspect.* A.J. Shaw Edition. CRC Press. Boca Rotan. Florida. Shaw,A.J Edition. P.P.155-177.

Bendjama .A. (2007). Niveaux de contamination par les métaux lourds du complexe lacustre« Tonga, Oubeira, El-mellah » du parc national d'El-kala. Mémoire de magister. Annaba. Université Badji Mokhtar.P.192.

Benkhaoua W., El Houchet H., Haridi S.,(2017) Recherche des bactéries tolérantes aux métaux lourds (Cadmium et cuivre) dans la région de Guelma. Mémoire de master. Santé, Eau et Environnement / Microbiologie de l'Environnement. Guelma.Université 8 Mai 1945 Guelma.P.31.

Barcina I., Lebaron P., Vives-Rego J. (1997). Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems.*Abiological approach FEMS Microbiol.Ecol.*Vol 23,P.1-9.

Berthet, B. ; Amiard, J.C. ; Amiard-triquet, C. & Metayer, C. (1985). Accumulation de quatre métaux (Cd, Pb, Cu, Zn) chez les animaux marins et côtiers et leurs interactions mutuelles. Actes du 1er Coll. Océanogr. côt. A.A/D.R.M. (DERMA), Bordeaux., 8-11 Octobre.

Berthomieu C., Chapon V., Gilbin R. (2008). Utiliser des bactéries pour dépolluer les environnements contaminés par des radionucléides. *Biofutur.*,Vol 295 , P.P.33-36.

-
- Bhaskar, P.V. , Bhosle, N.B. (2006)** Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environ. Int. Vol 32*,P.P.191–198.
- Blériot, C., Gault, M., Gueguen, E., Arnoux, P., Pignol, D., Mandrand-Berthelot, M.-A., Rodrigue, A. (2014).** Cu binding by the Escherichia coli metal-efflux accessory protein RcnB. *Metallomics.Vol 6*,P.P.1400–1409.
- Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Parkinson, J.A., Robinson, A.K., Cavet, J.S., Robinson, N.J., Sadler, P.J. (2001)** A metallothionein containing a zinc finger within a fourmetal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol 98.* P.P.9593–9598.
- Boopathy, R. (2000)** Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.vol 74*,P.P.63–67.
- Boufligha.KH, Kissoum.N, Menina.A (2013).** Résistance bactérienne aux antibiotiques et aux métaux lourds. Mémoire d'étude supérieur . Microbiologie.JIJEL. Université Jijel. P.51.
- Boukri K. , Rezzeli S. (2019).** Biosurveillance des ETM dans quelques stations du littorale de la région centre d'Algérie en utilisant un bioindicateur, la moule *Mytillus galloprovincialis* (Lamarck 1819).Mémoire de master.Biodiversité et Environnement. Tizi-Ouzou.Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. P.46.
- Bouziati M. (2000).** « L'eau de la pénurie l'eau de la pénurie aux maladies ». Oran. Edition Ibn - khaldoun, Algérie. P.247.
- Brown, N. L., Rouch, D. A., Lee, B. T. (1992).** Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid. Vol 27,* P.P.41-51.
- Brown N.L., Barrett S.R., Camakaris J., Lee B.T., Rouch D.A. (1995).** Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol. Microbiol.Vol 17*,P.P.1153-1166.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. (2000)** Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf. Vol 45*.P.P 198–207.
- Bryan, G.W. (1984).** Pollution due to heavy metals and their compounds. In O. KINNE (éd.) *Marine Ecology.* , London .John Wiley and Sons Ltd.,P.P. 1289- 1431.
- Burnol .A., Duro .L. , Grive .M.(2006).** Rapport d'étude : Eléments traces métalliques : Guide méthodologique : Recommandations pour la modélisation des transferts d'éléments trace métalliquesn,dans les sols et les eaux souterraines. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. P.138.

-
- Chiffolleau J.F. (2004)** .La contamination métallique.France.Ifremer Edition .P.39.
- Chitour R., Souilah N., (2018)**.Etude de l'antibiorésistance et de la tolérance aux métaux lourds des entérobactéries et des staphylocoques. Mémoire de master .Microbiologie appliquée. GUELMA.Université 8 mai 1945 GUELMA.P.66.
- Claisse, D. and Alzieu, C. (1993)** Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Mar. Pollut. Bull. Vol 26*,P.P.395–397.
- Cléa Bauvais.(2015)** Diversité chimique et bactéries associées à *Spongia officinalis*, une éponge marine accumulatrice de métaux. Thèse de doctorat. Écologie chimique et microbienne . France .Université Pierre et Marie Curie .P.244.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M. (2008)** Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. *J. Hazard. Mater. Vol 151*, P.P.185–193.
- De Philippis, R., Colica, G., , Micheletti, E. (2011)** Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 92*,P.P.697–708.
- DeForest D. K., K. V. Brix , W. J. Adams, 2007.** Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology*.
- Delarras C., Trébaol B. , Durand J. (2010)**, Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux.Paris. 2^{ème} édition, Lavoisier,P.P.65-106.
- Delarras, C., 2000.** Micobiologie de l'environnement avec législation : travaux pratique. Paris. Gaëtan moriu éditeur. P.231.
- Dellarras C. (2003).** Microbiologie de l'environnement avec législation. Travaux pratiques commentés. Gaetan Morin éditeur. 223-230pp.
- Duxbury T. (1981).** Toxicity of heavy metals to soil bacteria. *FEMS Microbiol. Lett. Vol 11*,P.P.217-220.
- Edward Raja Chellaiah (2018)** .Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa* . *Applied water science. Vol 8. N° 6*,P.P.1-10.
- El Solh, N. and Ehrlich, S.D. (1982).** A small cadmium resistance plasmid isolated from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.Vol 7*,P.P. 77-84.

Endo G., Narita M., Huang C., Silver S. (2002). Microbial Heavy Metal Resistance Transposons and Plasmids: Potential Use for Environ. *Biotech of Environ.* Vol 2, P.P.71- 82.

Enimie Endurance Oaikhena , Dominic Bawa Makaije , Samuel Dangmwan Denwe , Muhammad Muktar Namadi , Ali Ahmed Haroun (2016). Bioremediation Potentials of Heavy Metal Tolerant Bacteria Isolated from Petroleum Refinery Effluent. *Am J Environ Protect*, 2016.Vol. 5.N° 2,P.P. 29-34.

Fagan, M.J. , Jr, M.H.S. (1994) P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: Sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J. Mol. Vol.* 38.P.P. 57–99.

Faria c., Vaz-Moreira I., Serapicos E., Nunes O., Manaia C. (2009) . Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Science of the total environment.* Vol 407, N° 12,P.P.3876-3882.

Fiche technique API 20 E(2010). [En ligne]. [Consulté le 05/04/2022]. Disponible sur le site web (www.biomerieux.com).P.13.

Flih H. , Ferhi H. (2019). Aspect bactériologique d'un poisson pélagique (*Scomber japonicus* (Houttuyn, 1782)) pêché dans la région de Mostaganem. Mémoire de master . Ressources halieutiques. Mostaganem. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem .P.27.

FRIOUI S., (2017). Electro-extraction des métaux lourds en milieux aqueux complexe. Thèse de doctorat. Chimie industrielle. Guelma. Université 8 Mai 1945 de Guelma. P.P.13-14.

Gadd G.M. (1992). «Metals and microorganisms: A problem definition». *FEMS Microb.Lett.* Vol 100,P.P.197-204.

Gadd, G.M. (1990) Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia.* Vol 46. P.P.834–840.

Geesey, G.G., Bremer, P.J., Smith, J.J., Muegge, M., and Jang, L.K. (1992) Two-phase model for describing the interactions between copper ions and exopolymers from *Alteromonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* vol 38,P.P. 785–793.

Giller K. E., E. Witter , S. P. McGrath, 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* Vol 30,P.P.1389–1414.

Goldberg, E.D. (1995) Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. *Mar. Pollut. Bull.* Vol P.P. 31, 152–158.

Haouchine T., Leham K., (2016). Isolement de bactéries résistantes aux métaux lourds et évaluation de leur activité antagoniste vis-à-vis des microorganismes pathogènes. Mémoire de master. Microbiologie appliquée. Tizi-Ouzou. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.P.103.

Harakeh A. , saidi N., Cherif M., Boudabous A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technologie*. Vol 64,P.P. 7-15.

Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D. (2006) Microbial Exopolysaccharides. In, Dr,M.D.P., Falkow,S., Rosenberg,E., Schleifer,K.-H., and Stackebrandt,E. (eds), *The Prokaryotes*. Springer New York. ,P.P.766–776.

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

Hengstler, J.G., Bolm-Audorff, U., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Götte, W., et al. (2003) Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*.Vol 24.P.P.63–73.

Hill, M.K. (2004) Understanding Environmental Pollution .Cambridge University Press. 2ème Edition.P. 8.

Huynh.T. (2009).Impacts des métaux lourds sur l’interaction plante /ver de terre/ microflore tellurique. Thèse de doctorat.Paris. Université Paris Est.P.260.

INERIS (2010) Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : zinc et principaux composés. [En ligne]. [Consulté le 06/05/2022]. Disponible sur le site web (<http://rsde.ineris.fr/>).

Ji, G. , Silver, S. (1995) Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol*.Vol 14 .P.P.61–75.

Joffin , Leyral, (2003) Microbiologie technique, Tome 1 dictionnaire des techniques 4^{ème} Ed.scérén,Crdp.aquiraine.P.P.22-23.

Jones, W.R. (1998) Practical applications of marine bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol*.Vol 9,P.P. 300–304.

Journal Officiel De la République Algérienne Démocratique Et Populaire (JORADP) (1993). Paramètres de qualité de l'eau JORADP le 14 juillet 1993. Impr. Office,P.P. 11-12.

Kabata-Pendias .A. , Pendias .H. (2001). Trace elements in soils and plants. . London. 3ème édition. CRC Press, Boca Raton.P.413.

Kachur, A.V., Koch, C.J., Biaglow, J.E. (1998) Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Radic. Res. Vol* 28. P.P.259–269.

Kaluzhnaya, O.V. , Itskovich, V.B. (2014) Phylogenetic diversity of microorganisms associated with the deep-water sponge *Baikalospongia intermedia*. *Russ. J. Genet. Vol* 50, P.P.667–676.

Katranitsas, A., Castritsi-Catharios, J., Persoone, G. (2003) The effects of a copper-based antifouling paint on mortality and enzymatic activity of a non-target marine organism. *Mar. Pollut. Bull. Vol* 46,P.1491.

Kennedy, A.F. , Sutherland, I.W. (1987) Analysis of bacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem. Vol* 9,P.P.12–19.

Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Vol* 5 ,P.P. 282–295.

Lemière B., Seguin J.J., Le Cuern C., Guyonnet D. , Baranger P. (2001). Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. BRGMIRP-50662-FR, P.25.

Letendre .J. (2009). Effets combinés de l'intertidalité et de la contamination chimique chez *Mytilus edulis* : Mécanismes enzymatiques antioxydants et approche protéinique. Thèse de doctorat.France. Université du Havre. P. 343.

Lloyd J.R. , Lovley D.R. (2001). Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Current Opinion in Biotechnology. Vol* 12, P.P.248-253.

Lloyd, J.R. (2002) Bioremediation of metals; the application of micro-organisms that make and break minerals. The Department of Earth Sciences, University of Manchester, Manchester M13 9PL, UK. Vol 29 .P.P.67-68.

Loué .A. (1993). Oligo-éléments en agriculture. 2ème édition. Editions Nathan. Paris. 577p.

Lovley, D.R. , Coates, J.D. (1997) Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol. Vol* 8, P.P.285–289.

Macaskie L.E., Bonthron K.M., Yong P., Goddard D.T. (2000). Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular

lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. *Microbiol.Vol* 146, P.P.1855-67.

Mallevalle J., Chambolle T. (1990). La Qualité de l'eau, La recherche.Vol 21. N° 221.P.P.598-606.

Malmavist B., Rundle S. (2002). Threats to the running water ecosystems of the world. *Environmental Conservation* 29 (in press). *Environmental conservation.Vol*29. N°2, P.P.134-153.

Mejáre, M. , Bülow, L. (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.Vol* 19,P.P.67–73.

Mills, A. L. R. R. Colwell, 1977. Microbiological effects of metal ions in Chesapeake Bay and sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*

Monchy S. (2007). « Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidusmetallidurans* CH34 ». Thèse de doctorat en science, ULB.Bruxelles.P.P.15-33.

Mudryk, Z., Perliński, P., Skórczewski, P. (2010). Detection of antibiotic resistant bacteria inhabiting the sand of non-recreational marine beach. *Marine Pollution Bulletin.Vol* 60.N°2, P.P.207-214.

Nakahara Hideomi, Ishikawa Tomoaki, Sarai Yasunaga, Et Al(1977). Frequency of heavy-metal resistance in bacteria from inpatients in Japan. *Nature. Vol.* 266, N° 5598, P.P.165-167.

Nelson N. (1999). Metal ion transporters and homeostasis . *The EMBO Journal. Vol* 18.N°16. P.P.4361-71.

Nezengue .Y. (2008). Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc: place des métallothionéines. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier Grenoble. P.297.

Ni'bhriain, Niamh , Foster, Timothy J (1986). Polypeptides specified by the mercuric resistance (mer) operon of plasmid R100. *Gene. Vol* 42. N° 3, P.P.323-330.

Nies .D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance.*Appl Microbiol Biotechnol .Vol* 51, N°6.P.P.730-750.

Nies, D.H. , Silver, S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.Vol* 14,P.P.186–199.

Nisbet, E.G. , Fowler, C.M.R. (1995). Is metal disposal toxic to deep oceans? .Vol 375.P.715.

O.M.S ,Organisation mondiale de la santé (1979).principe et directives applicables au déversement de déchets dans le milieu marin. P.P.551-554.

Osborn, A. Mark, Bruce, Kenneth D., Strike, Peter, Et Al (1997). Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon. *FEMS Microbiology Reviews*.Vol. 19. N° 4,P.P. 239-262.

Pennanen T., Å. Frostegård, H. Fritze, , E. Bååth. (1996). Phospholipid fatty acid Composition and Heavy Metal Tolerance of Soil Microbial Communities Along Two Heavy-Metal-Polluted Gradients in Coniferous Forests. *Appl. Environ. Microb.* Vol 62.P.P.420-428.

Perron K., Caille O., Rossier C., Van Delden C., Dumas J.L., Kohler T. (2004). CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*Vol 279, P.P.8761-8768.

Pickett, A.W. , Dean, A.C.R. (1976). Cadmium and zinc sensitivity and tolerance in *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes*. *Microbios*.Vol 15,P.P. 79-91.

Pollmann K., Raff J., Merroun M., Fahmy K., Selenska-Pobell S. (2006). Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotech. Adv.*Vol 24, P.P.58-68.

Quincampoix, J. C. , Mainardi, J. L(2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation*.vol 10, no 3, P.P.267-275.

Renninger N., Knopp R., Nitsche H., Clark D.S., Keasling J.D. (2004). Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*Vol 70.N°12, P.P.7404-12.

Robert .M., Juste .C. (1999). Enjeux environnementaux et industriels : Dynamique des éléments traces dans l'écosystème sol, in :Spéciation des métaux dans le sol. Les Cahiers des Clubs CRIN. Paris. France. P.P.15–37.

Rodier J., B. Legube , N. Merlet (2009). *L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer*. Paris, France, 9^{ème} édition, Dunod édition, P.1579.

Rodier J., Bazin C., Chambon P., Broutin J.P., Champsaud H., Rodi L.,(1996). Analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduelles, eau de mer. Paris .8ème édition. DUNOD édition..P.1983.

Rodier, J., 1996. L'analyse de l'eau ; eaux naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. 8ième édition. Paris. 1383p.

Rodier, J., Legure, B., Merlet, N., 2009. L'analyse de l'eau ; eaux naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. Paris. 9ème édition. P.1526.

Rouch .D.A., Lee .B.T.D. , Morby .A.P. (1995). Understanding cellular Responses to Toxic Agents: A Model for Mechanism Choice in Bacterial Metal Resistance.J. Ind. Microbiol. Vol 14.P.P.32-141.

Salah Habi (2018).Etude de la Métallo-résistance et de l'Halo-tolérance des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la Région de Sétif. Thèse de doctorat. Microbiologie. Sétif Université "Ferhat ABBAS" – Sétif. P.101.

Savolainen .H. (1996). Biochemical and clinical aspects of nickel toxicity. Rev. Environ. Health. Vol 11.P.P.167-173.

Schiff, K., Diehl, D., Valkirs, A. (2004) Copper emissions from antifouling paint on recreational vessels. *Mar. Pollut. Bull.*vol 48,P.P. 371–377.

Scott, J.A. , Palmer, S.J. (1988) Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnol. Lett.*vol 10. P.P.21–24.

Scott, J.A. , Palmer, S.J. (1990) Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*vol 33.P.P. 221–225.

Sellami R., Zitouni I., (2020).Analyse en composante principales des transferts des nutriments de l'oued Mazafrane vers la baie de Bou-smaïl (Mitidja, Alger).Mémoire de master. Ressources hydrauliques.Blida.Université SAAD DAHLAB- BLIDA-1.P.15.

Sigg L., Behra P., Stumm W. (2001). Chimie des milieux aquatiques chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. Paris. 3eme édition, Dunod,

Silver S, M. Walderhaug. (1992). Gene Regulation of Plasmid and Chromosome-Determined Inorganic Ion Transport in Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*Vol 56,P.P.195–238.

Silver, Simon , PHUNG, Le T (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual review of microbiology* .vol 50. N° 1,P.P 753-789.

Silver S., Gangyong J. I. 1994. Newer systems for bacterial resistance's to toxic heavy metals. *Environ. Health perspect.* vol 102, P.P. 107-113.

Silver, S. , Phung, L. (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* vol 32. P.P.587–605.

Spain A. , Alm E. (2003). Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergraduate Research*, Vol. 2, P.P. 1-6.

Summers, Anne O. , Silver, Simon(1978). Microbial transformations of metals. *Annual Reviews in Microbiology*, 1978, vol. 32, N° 1, P.P.637-672.

Tynecka, Z., Gos, Z. Zajac, J. (1981). Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* vol 147, P.P.313-319.

Ünalı Coral, M. N., H. Kormaz, B. Arıkan , G. Coral, (2005). Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter* spp. isolated from Sofulu Landfill, in Adana, Turkey. *An. Microbiol.* Vol 55, P.P.175-179.

Vavasseur, A., Peltier, G., Pignol, D., Bourguignon, J., Coves, J. (2003) Bio-depollution, bio-remediation. vol 35, P.P. 85-88.

Wakatsuki, T. (1995) Metal oxidoreduction by microbial cells. *J. Ind. Microbiol.* vol 14, P.P.169–177.

Watanabe, K. (2001) Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* Vol 12, P.P. 237–241.

Weast, R.C., Astle, M.J., Beyer, W.H. (1984) CRC handbook of chemistry and physics 64 edn. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Wright .D.A. , Welbourn .P. (2002). Environmental Toxicology. 1er édition Cambridge environmental Chemistry Series (Livre 11). Cambridge University Press. P.658.

Zhang, S., Yang, G., Jiang, Y. (2022). Antibiotic and metal resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Eboling permafrost of the Tibetan Plateau. *Environmental Science and Pollution Research*, P.P.1-13.

Zhao .F.J., Lombi .E., Breedon .T. , McGrath .S.P. (2000). Zinc hyper accumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* Vol 23. P.P. 507-514.

Résumé :

Le but de ce travail est l'évaluation et la caractérisation de la résistance aux métaux lourds chez la flore totale et les coliformes totaux, isolées à partir de l'environnement marin dans des zones à différents apports anthropiques.

La résistance aux métaux lourds des isolats de l'environnement marin a révélé la présence d'une multirésistance aux divers métaux lourds testés. La résistance au mercure était la plus répandue dans la plupart des stations. La présence des souches multirésistantes aux métaux lourds ont un intérêt dans la décontamination des milieux pollués par les métaux.

Mots clés : résistance ; métaux lourds ; flore totale ; coliformes totaux.

Abstract :

The aim of this work is the evaluation and characterization of resistance to heavy metals in total flora and total coliforms, isolated from the marine environment in areas with different anthropogenic inputs.

Heavy metal resistance of isolates from the marine environment revealed the presence of multiple resistance to the various heavy metals tested. Mercury resistance was most prevalent at most stations. The presence of strains multiresistant to heavy metals has an interest in the decontamination of environments polluted by metals.

Keywords: resistance; heavy metals; total flora; total coliform.

المخلص:

الهدف من هذا العمل هو تقييم وتوصيف مقاومة البكتيريا للمعادن الثقيلة ، المعزولة من البيئة البحرية في المناطق ذات تدخلات البشرية المختلفة.

مقاومة البكتيريا للمعادن الثقيلة المعزولة من البيئة البحرية اظهرت وجود مقاومة متعددة للعديد من المعادن الثقيلة المختبرة ، وكانت مقاومة الزئبق هي الأكثر انتشاراً في معظم المحطات .وجود سلالات متعددة المقاومة للمعادن الثقيلة لها مصلحة في تطهير البيئات الملوثة بالمعادن.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا , المقاومة , المعادن الثقيلة .

