

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 et de
Master en sciences de la mer
Option : Biotechnologie Marine**

Thème:

**Evaluation et isolement des bactéries résistantes aux
métaux lourds à partir de poissons et leur potentiel à
éliminer le chrome**

Présenté par :

**Djarir Ikram
Nour Yousra**

Soutenu le 25/09/2023 devant le jury composé de :

Mme KHLIFA N.	Maitre de conférences classe A	ENSSMAL	Présidente
Mme ALOUACHE S.	Professeure	ENSSMAL	Promotrice
Mme CHAOU N.	Maître assistante classe A	ENSSMAL	Examinatrice
Mme Maouel D.	Maitre assistante classe B	ENSSMAL	Incubateur
Mme Mahi Z.		Anvredet	Examinatrice

Année universitaire : 2022 / 2023

Remerciements

Ce travail rentre dans le cadre des activités de recherche de l'équipe microbiologie-biotechnologie-LCVRM à l'ENSSMAL. Sa réalisation a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre gratitude.

Nous souhaitons avant tout remercier notre promotrice, **Mme. ALOUACHE Souhila**, Professeur à l'ENSSMAL, d'avoir proposé ce thème et pour le temps qu'elle a consacré pour la bonne conduite de cette recherche sur le plan pratique et théorique. Son exigence nous a grandement stimulées, pour sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nos remerciements vont également au présidente Mme. KHLIFA N, Maitre de conférences classe A et aux membres du jury Mme. CHAOU N, Maître assistante classe A, Mme. Maouel D, Maitre assistante classe B et Mme Mahi Z. Anvredt qui ont bien voulu examiner ce travail.

Nous remercions également les ingénieurs de laboratoire de l'ENSSMAL qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail en particulier M. MAATOUK Y., Mme REFES N., M. DJERAI N., Mme GERROUMI H. et M. AROUA M.

Nous remercions Mme TOUAHIR N., pour l'aide apporté dans l'analyse statistique de ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les enseignants intervenants durant notre cursus, aux coachs et aux membres de l'incubateur de l'ENSSMAL, au personnel administratif et de la bibliothèque pour leur contribution dans notre formation tout le long de notre cursus d'études.

Dédicaces

« ومن يتوكل على الله فهو حسبه » :

صدق الله العظيم

Tout d'abord je remercie **ALLAH** tous puissant qui m'a permit de suivre mes études et m'a muni de volonté, force et patience à fin de réaliser ce travail.

A mes chers parents source de tendresse, de volonté, et de patience .mes yeux à travers lesquels j'ai vu et je vois ce monde. Je vous remercie d'être toujours à mes cotés de me soutenir, aimer, protéger et pour tous ce que vous avez fait pour moi.

A ma sœur ma deuxième maman **AMINA**

A mes frères **IHAB - YACINE - RAYAN**

A ceux qui m'ont soutenu et aidé sur mon chemin **HAMZA**, merci d'être toujours à mes côtés

A celles qui je passe avec elles les bonnes heures et je porte avec elles que les bons souvenirs

A toutes mes amies surtout **Yousra - RABAB**

A toutes les familles : **DJARIR - BOUOUADNINE - Kettou**

A toute la promotion de biotechnologie marine (2022/2023)

Et A tous ceux qui me connaissent de près ou de loin

DJARJR JKRAM

Dédicaces

Tout d'abord, louange à ALLAH le clément, le tout puissant qui nous a
Procuré la patience, la force et le courage d'aller au bout de notre
objectif.

Je dédié ce modeste travail particulièrement, A **Mes parents**, qui ont
consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et
soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je
puisse arriver à ce stade

A **ma mère** « jamila » qui m'a encouragé durant toutes mes études, et
qui, sans elle, ma réussite n'aura pas eu lieu.

A **mon père** Abd al Hadi qui est toujours disponible pour nous, et prêt à
nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.

A **mes très chères sœurs** : Imene et Basma

A **mes chers frères** : faiz , amir , mohamed radi

A **tous mes amis** : Ikram , khawla, cilya , Manel

NOUR YOUSRA

Sommaire

INTRODUCTION	12.
I-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I-1-Les métaux lourds.....	15.
I.1.1.Toxicité des métaux lourds.....	16
I.1.1.1. Impacts sur l'environnement.....	16
I.1.1.2-Impacts sur la santé humaine.....	17
I.1.1.3-Impacts sur les organismes aquatiques.....	17.
I.2- Les bactéries et les métaux lourds.....	17
I.2.1. Les Mécanismes de résistance aux métaux lourds	18
I.2.1.1. Modifications dans la paroi	19
I.2.1.2. Séquestration	19
I.2.1.2.1. La séquestration intracellulaire	19
I.2.1.2.2. La séquestration extracellulaire	19
I.2.1.3. La conversion enzymatique: Détoxification.....	20
I.2.1.4. Système d'efflux	20
I.2.1.5. Co-sélection de la résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques.....	20
I.3-Application des bactéries résistantes au traitement des eaux chargées enmétaux lourds : Cas du chrome.....	22
I.3.1. Traitement des eaux chargées par le chrome IV.....	23
I.3.1.1. Le chrome, propriétés physicochimique	23
I.3.1.2. Le chrome dans l'environnement.....	23
I.3.1.3. Toxicité du chrome.....	24
I.3.1.4. Elimination du chrome.....	24
I.3.1.4.1. Les techniques physico-chimiques	24
I.3.1.4.2 Les procédés biologiques.....	24

Sommaire

II: Matériel et méthodes

II.1-Les outils de travail.....	27
II.2- Echantillonnage et site d'études.....	28
II.3-Préparation de la solution mère.....	30
II.4- Evaluation de la résistance aux métaux lourds.....	30
II.5-Conservation et mise en place d'une collection de souches résistantes auxmétaux lourds.....	31
II.6-Identification des bactéries résistantes.....	31
II.6.1. La 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.....	33
II.6.3.1. Recherche des staphylocoques sur Chapman.....	33
II.6.3.2. Recherche des streptocoques.....	33
II.6.3.3. Test de la catalase.....	33
II.7- Détermination du profil de résistance aux métaux lourds des souchesbactériennes isolées par la méthode de dilution en milieu gélosé.....	34
II.8-Détermination des résistances associées aux antibiotiques des souches bactériennes isolées.....	34
II.9-Essais d'élimination du chrome par des souches résistantes aux métauxlourds (Serratiaodorifera, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus).....	34
II.9-1-Détermination du profil de résistance au chrome des souches bactériennesisolées.....	34
II. 9 -2- L'application des souches pour l'élimination du chrome IV.....	35
II.9-2-1-Effet de la concentration initiale.....	35
II.9-2-2-Effet de l'inoculum.....	35
II.9-2-3- Effet du Ph.....	35
II.9-2-4-Dosage du Chrome.....	35

Sommaire

III: Résultats et Discussion

III.1-Prévalence de la résistance aux métaux lourds des bactéries de la sardine et du rouget.....	38
III.1-1 chez la flore totale.....	38
III.1-2 chez les coliformes.....	39
III.2-Identification des souches résistantes isolées.....	41
III.3-Résultats des profils de résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques associés des souches bactériennes isolées.....	45
III.4- Etude du potentiel des souches à l'élimination du Chrome et l'influence des différents paramètres.....	48
III.4-1-Cas de la souche <i>Serratia odorifera</i> R1.....	49
III.4-1-1 Effet de l'inoculum et de la concentration du CrVI sur la croissance microbienne.....	49
III.4-1-2 Effet de l'inoculum et de la concentration initiale du Cr VI sur l'élimination du Chrome VI.....	52
III.4-1-3 Effet du pH sur la croissance et sur l'élimination du chrome.....	52
III.4-2- Cas de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> R17.....	55
III.4-2-1- Effet de l'inoculum et de la concentration du CrVI sur la croissance microbienne.....	55
III.4-2-2- Effet de l'inoculum et de la concentration initiale du CrVI sur l'élimination du Chrome VI.....	57
III.4-2-3 Effet du pH sur la croissance et sur l'élimination du chrome.....	57
III.4-3- Cas de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> S16.....	60
III.4-3-1- Effet de l'inoculum et de la concentration du CrVI sur la croissance Microbienne.....	60
III.4-3-2- Effet de l'inoculum et de la concentration initiale du CrVI sur l'élimination du Chrome VI.....	62
III.4-3-3-Effet du pH sur la croissance et sur l'élimination du chrome.....	62
CONCLUSION	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70
ANNEXE	80

Liste des figures

Figure 1 : Origine des métaux lourds	17
Figure 2 : Exemples de quelques mécanismes de résistance bactérienne aux métaux lourds	20
Figure 3 : Exemple de mécanismes de co-sélection de la résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques	23
Figure 4 : la localisation de la zone bouharoun alger	30
Figure 5 : la carte de la zone bouharoun alger	30
Figure 6 : <i>Sardina pilchardus</i>	31
Figure 7 : <i>Mullus barbatus</i>	32
Figure 8 : Identification biochimique Galerie API20E.....	34
Figure 9 : Schéma représentant les étapes d'identification des cocci à GRAM positifs.....	35
Figure 10 : La résistance aux métaux lourds chez la flore totale de la sardine et du rouget	40
Figure 11 : La résistance aux métaux lourds chez les coliforme totaux de la sardine et du rouget	42
Figure 12 : Répartition des bactéries résistante aux métaux lourds selon le Gram.....	43
Figure 13 : La multi-résistance des souches aux métaux lourds (A) métaux lourds, (B),antibiotiques	47
Figure 14a : Suivi de la croissance microbienne de <i>Serratia Odorifera</i> R1 à DO=600 nm pour différents inoculum (1%,5% ;10%) en absence du chrome	32
Figure 14b : Suivi de la croissance microbienne de <i>Serratia Odorifera</i> R1 à DO=600 nm pour différents inoculum (1%,5% ;10%) en présence de 100mg/l de chrome	32
Figure 14c : Suivi de la croissance microbienne de <i>Serratia Odorifera</i> R1 à DO=600 nm pour différents inoculum (1%,5% ;10%) en présence de 200mg/l de chrome.....	32
Figure 15a : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de <i>S.odorifera</i> R1 à DO= 600 nm pour inoculum de 1%.....	33
Figure 15b : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de <i>S.odorifera</i> R1 à DO= 600 nm pour inoculum de 5%.....	33
Figure 15c : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de <i>S.odorifera</i> R1 à DO= 600 nm pour inoculum de 10%.....	33
Figure 16a : Suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 100mg/l par <i>S.odorifera</i> R1 à différentes concentrations de l'inoculum.....	34
Figure 16b : Suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 200mg/l par <i>S.odorifera</i> R1 à différentes concentrations de l'inoculum	34
Figure 17 a : Effet de PH sur la croissance microbienne de <i>S.odorifera</i> R1 en présence de 100mg/l de chrome et inoculum de 1%.....	35
Figure 17 b : Effet de PH sur la croissance microbienne de <i>S.odorifera</i> R1 en présence de 100mg/l de chrome et inoculum de 5%.....	35

Liste des figures

Figure 17 c : Effet de PH sur la croissance microbienne de S.odorifera R1 en présence de 100mg/l de chrome et inoculum de 10%.....	35
Figure 18 a : Effet de PH sur la croissance microbienne de S.odorifera R1 en absence de chrome et inoculum de 1%.....	35
Figure 18 b : Effet de PH sur la croissance microbienne de S.odorifera R1 en absence de chrome et inoculum de 5%.....	35
Figure 18 c : Effet de PH sur la croissance microbienne de S.odorifera R1 en absence de chrome et inoculum de 10%.....	35
Figure 19 a : Effet de PH sur 'élimination de 100mg/l de chrome en présence d'un inoculum de 1%.....	36
Figure 19 b : Effet de PH sur 'élimination de 100mg/l de chrome en présence d'un inoculum de 5%	36
Figure 19 c : Effet de PH sur 'élimination de 100mg/l de chrome en présence d'un inoculum de 10%.....	36
Figure 20a : Suivi de la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 à DO=600 nm pour différents inoculum (1%,5% ;10%) en absence du chrome	37
Figure 20b : Suivi de la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 à DO=600 nm pour différents inoculum (1%,5% ;10%) en présence de 100mg/l de chrome	37
Figure 20c : Suivi de la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 à DO=600 nm pour différents inoculum (1%,5% ;10%) en présence de 200mg/l de chrome.....	37
Figure 21a : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 à DO= 600 nm pour inoculum de 1%.....	38
Figure 21b : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 à DO= 600 nm pour inoculum de 5%.....	38
Figure 21c : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 à DO= 600 nm pour inoculum de 10%.....	38
Figure 22a : Suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 100mg/l par P .aeruginosa R17 à différentes concentrations de l'inoculum.....	39
Figure 22b : Suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 200mg/l par P .aeruginosa R17 à différentes concentrations de l'inoculum.....	39
Figure 23 a : Effet de PH sur la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 en présence de 100mg/l de chrome et inoculum de 1%.....	40
Figure 23 b : Effet de PH sur la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 en présence de 100mg/l de chrome et inoculum de 5%.....	40
Figure 23c : Effet de PH sur la croissance microbienne P .aeruginosa R17 en présence de 100mg/l de chrome et inoculum de 10%.....	40
Figure 24a a : Effet de PH sur la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 en absence de chrome et inoculum de 1%.....	41
Figure 24 b : Effet de PH sur la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 en absence de chrome et inoculum de 5%.....	41

Liste des figures

Figure 24 c : Effet de PH sur la croissance microbienne de P .aeruginosa R17 en absence de chrome et inoculum de 10%.....	42
Figure 25 a : Effet de PH sur ‘élimination de 100mg/l de chrome en présence d’un inoculum de 1%.....	43
Figure 25 b : Effet de PH sur ‘élimination de 100mg/l de chrome en présence d’un inoculum de 5%.....	43
Figure 25 c : Effet de PH sur ‘élimination de 100mg/l de chrome en présence d’un inoculum de 10%.....	43
Figure 26a : Suivi de la croissance microbienne de S.aureus R16 à DO=600 nm pour différents inoculum (1%,5% ;10%) en absence du chrome	44
Figure 26b : Suivi de la croissance microbienne de S.aureus R16 à DO=600 nm pour différents inoculum (1%,5% ;10%) en présence de 100mg/l de chrome	44
Figure 26c : Suivi de la croissance microbienne de S.aureus R16 à DO=600 nm pour différents inoculum (1%,5% ;10%) en présence de 200mg/l de chrome.....	44
Figure 27a : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de S.aureus R16 à DO= 600 nm pour inoculum de 1%.....	45
Figure 27b : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de S.aureus R16 à DO= 600 nm pour inoculum de 5%.....	45
Figure 27c : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de S.aureus R16 à DO= 600 nm pour inoculum de 10%.....	45
Figure 28a : Suivi de l’élimination du chrome à une concentration initiale de 100mg/l par S.aureus R16 à différentes concentrations de l’inoculum	46
Figure 28b : Suivi de l’élimination du chrome à une concentration initiale de 200mg/l par S.aureus R16 à différentes concentrations de l’inoculum.....	46
Figure 29 a : Effet de PH sur la croissance microbienne de S.aureus R16 en présence de 100mg/l de chrome et inoculum de 1%.....	47
Figure 29 b : Effet de PH sur la croissance microbienne de S.aureus R16 en présence de 100mg/l de chrome et inoculum de 5%.....	47
Figure 29 c : Effet de PH sur la croissance microbienne S.aureus R16 en présence de 100mg/l de chrome et inoculum de 10%.....	47
Figure 30 a : Effet de PH sur la croissance microbienne de S.aureus R16 en absence de chrome et inoculum de 1%.....	48
Figure 30 b : Effet de PH sur la croissance microbienne de S.aureus R16 en absence de chrome et inoculum de 5%.....	48
Figure 30 c : Effet de PH sur la croissance microbienne de S.aureus R16 en absence de chrome et inoculum de 10%.....	48
Figure 31 a : Effet de PH sur ‘élimination de 100mg/l de chrome en présence d’un inoculum de 1%.....	49
Figure 31 b : Effet de PH sur ‘élimination de 100mg/l de chrome en présence d’un inoculum de 5%.....	49
Figure 31 c : Effet de PH sur ‘élimination de 100mg/l de chrome en présence d’un inoculum de 10%.....	49

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Sources anthropogéniques de quelques métaux lourds.....	17
Tableau 02: Les outils de travail utilisés.....	29
Tableau 03: Résultats de la coloration de Gram pour 40 souches résistantes aux métaux lourds isolées.....	44
Tableau 04: Résultats de l'identification de 25 souches à Gram négatif résistantes aux métaux lourds par la galerie API20E.....	46
Tableau 05: Profil de résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques associés chez les souches résistantes isolées.....	48
Tableau 06: Résultats de la tolérance des souches aux différentes concentrations du Chrome IV.....	51

Liste des abréviations

Symbole	Signification
%	Pourcentage
°C	Degrés Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
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
Cr III	Chrome trivalent
Cr VI	Chrome hexavalent
CT	Coliformes totaux
Cu	Cuivre
EPS	Substances Polymériques Extracellulaires
Gx	Grossissement
H	Hydrogène
Hg	Mercure
Kg	Kilogramme
Km	Kilomètre
Mg	Milligramme
EPS	substances polymériques extracellulaires

Liste des abréviations

Mg	Magnésium
MH	Milieu Muller Hinton
min	Minute
ml	Millilitre
Mn	Manganèse
Ni	Nickel
O	Oxygène
Pb	Plomb
R	Souche résistante
RND	Resistance-Nodulation-Cell Division
S	Souche sensible
Ti	Titanium
Z	Nombre atomique
Zn	Zinc
V	Vanadium
AMX	Amoxicilline
CTX	Céfotaxime
CAZ	Ceftazidime
CIP	Ciprofloxacine
Gen	Gentamicine
RA	Rifampicine
Nm	Nanomètre
S	Sardine
R	Rouget

Introduction

Le rejet massif et brutal de polluants toxiques (les métaux lourds) dans l'environnement, constitue un risque écologique important pour la faune et la flore, ainsi qu'un danger réel pour la santé de l'homme. La dégradation de l'environnement due à la pollution, est générale et concerne tous les milieux (air, eau et sol).

Les bactéries disposent de nombreux mécanismes de résistance, plus ou moins efficaces contre les molécules toxiques auxquelles elles sont naturellement confrontées dans leur environnement, en particulier certains métaux lourds et antibiotiques.

La dissémination de cette résistance bactérienne aux antibiotiques et aux métaux lourds, est une préoccupation majeure en santé publique puisqu'elle s'est développée très rapidement. Elle a dépassé le cadre clinique pour devenir une problématique écologique touchant différents compartiments dont le compartiment aquatique (**De Forest et al., 2007, Croteau et al., 2005**). Ce dernier compartiment, par la pression de sélection exercée, verra la dissémination de cette résistance aux agents antimicrobiens dans les sédiments et les biotes.

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. La possibilité du transfert de leur caractère de résistance dans l'environnement extérieur a inquiété la communauté scientifique, à cause des risques écologiques et sanitaires soupçonnés. Plusieurs études, ont été réalisées afin d'évaluer et de caractériser la résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques chez les bactéries dans différents compartiments y compris le milieu aquatique (**Endo et al., 2002, Martinez et al., 2009**).

En plus, de cette valeur écologique et environnementale, cette étude nous permettra d'isoler des bactéries ayant un potentiel de tolérance à ces métaux et qui peuvent être utilisées pour le traitement des effluents synthétiques chargés en chrome. Le choix de ce métal est dû au besoin de traitement des effluents issus de tanneries ou d'entreprises métallurgique et à sa toxicité.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude a été divisé en deux parties :

- 1/ Evaluation et caractérisation de la résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques associés chez des bactéries isolées à partir de poissons d'habitats différents.
- 2/ Application des bactéries résistantes isolées à l'élimination du chrome VI

Le premier chapitre de notre étude sera consacré à l'étude bibliographique qui rassemble d'une part des généralités sur les métaux lourds dans le milieu marin et

Introduction

d'autre part la résistance bactérienne aux métaux lourds et quelques utilisations biotechnologiques des bactéries résistantes (la bioremédiation).

Le second chapitre s'intéresse à l'étude expérimentale consacrée aux méthodes utilisées pour l'analyse bactériologique, la recherche et la caractérisation des bactéries tolérantes et leur application pour l'élimination du chrome.

Le 3^{ème} chapitre regroupe l'ensemble des résultats et leurs discussions.

Enfin, une conclusion achèvera ce travail.

Chapitre I:

Synthèse bibliographique

I-1 -Les métaux lourds

Les métaux lourds sont des éléments chimiques inorganiques, contaminant, présents de façon naturelle dans les sols. Ils proviennent en grande partie de l'altération de la roche mère du sous-sol. En effet, l'exploitation des gisements, l'érosion, les prélèvements d'eau ou les éruptions volcaniques va répandre des traces de ces éléments dans l'environnement. Ils peuvent alors devenir toxiques s'ils se retrouvent en quantités suffisantes dans les organismes vivants.

Toutefois, les concentrations les plus importantes de métaux lourds dans les sols sont liées à l'activité humaine: stockage de déchets industrielles et urbains (mines et fonderies de métaux non ferreux, décharges publiques); pollution dues à des retombées atmosphériques (essence ou plomb, poussière des industries métallurgique, incinération des ordures ménagères...) (figure1, tableau 1).

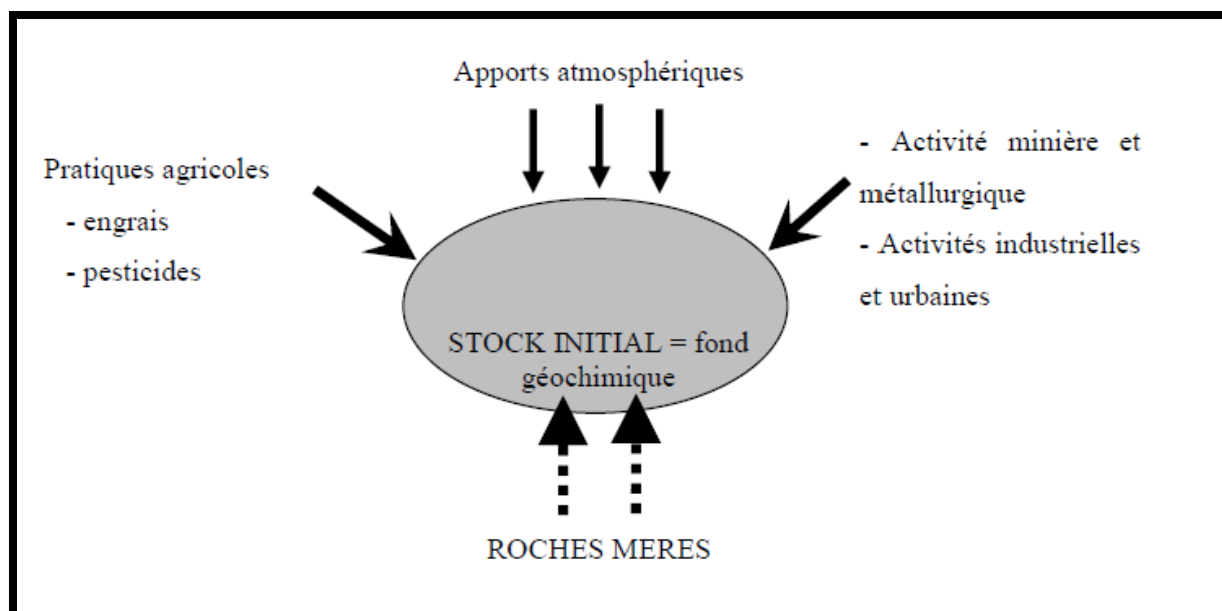


Figure 1: Origine des métaux lourds (Robert et Juste, 1999).

Tableau 01: Sources anthropogéniques de quelques métaux lourds (Hazrat et al., 2013).

Métaux lourds	Sources
As	-pesticides et préservation du bois
Cd	-peinture et pigment, stabilisants de plastique, fertilisants phosphatés...etc.
Cr	-tanneries, industrie textile, pesticides, fertilisants...etc.
Cu	-pesticides, fertilisants
Hg	-combustion de charbon, déchets médicaux, activités minières
Ni	-effluents industriels, instruments chirurgicaux, batteries d'automobile
Pb	-combustion de carburant à plomb, batteries, herbicides et insecticides

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

➤ Métaux essentiels

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires (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, au-delà d'un certain seuil, ils peuvent devenir toxiques. (Kabata et Pendias, 2001).

➤ Métaux non essentiels

Ils 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.1.1. Toxicité des métaux lourds

I.1.1.1. Impacts sur l'environnement : La présence des métaux lourds dans l'air, le sol et l'eau représente une menace pour l'environnement et la santé humaine. Les principales menaces des métaux lourds sur la santé humaine sont associées à l'exposition au Pb, Cd, Hg et l'As. (Ghosh, 2010).

En plus de leur toxicité, les métaux lourds ont un long temps de séjour dans l'environnement, une longue demi-vie biologique. D'autre part, l'introduction des métaux lourds, sous diverses formes dans l'environnement, peut produire des modifications considérables dans les communautés microbiennes et leurs activités (Nithya *et al.*, 2011).

a) Les métaux lourds dans l'eau : L'eau transporte les métaux lourds et les insère dans les chaînes alimentaires. Même si ces derniers sont le plus souvent présents à l'état de traces, leur toxicité se développe par bioaccumulation dans les tissus vivants. Les métaux lourds dispersés sont immobilisés par adsorption sur les minéraux argileux et hydroxydes de Fe et Mn ou absorbés par les algues à un niveau trophique inférieur dans la chaîne alimentaire. Ces métaux lourds peuvent s'accumuler dans des niveaux supérieurs dans les chaînes alimentaires et provoquent des dommages (Kaimoussi *et al.*, 2005).

b) Les métaux lourds dans le sol : La contamination des sols par les métaux lourds est un grand problème environnemental dans le monde, cette contamination présente des risques considérables pour la santé publique et les écosystèmes (Sheng *et al.*, 2008). Ils peuvent avoir des effets importants sur les populations microbiennes indigènes. Ils peuvent réduire la biodiversité microbienne, limiter leur reproduction, et leur activité comme la fixation de l'azote dans les rhizobiums. Chaque métal a des bio-fonctions uniques ou bio-toxicités. Par exemple, le cuivre peut faire augmenter la croissance microbienne à faibles concentrations mais à fortes concentrations, il

l'inhibe. En revanche, le cadmium a une toxicité élevée même à faible concentration (**Gehong et al., 2009**).

I.1.1.2-Impacts sur la santé humaine :

Les métaux lourds ont des effets néfastes sur la santé humaine et la contamination des chaînes alimentaires par les métaux lourds mérite une attention particulière. De nombreux métaux lourds et métalloïdes sont toxiques et peuvent provoquer des effets indésirables et des problèmes sévères pour l'homme, même à de très faibles concentrations (**Memon et Schröder, 2009**).

D'un point de vue toxicologique, les métaux les plus toxiques sont : Hg, Cd, Pb, As, Cu, Zn, Sn, et le Cr. La toxicité des métaux varie aussi selon la dose et la durée d'exposition. Une exposition de courte durée à des concentrations élevées cause des syndromes aigus, alors qu'une exposition de longues durées à de faibles concentrations, provoque des troubles chroniques. La gastroentérite, la pneumonie et l'insuffisance rénale et hépatique sont les troubles les plus fréquemment observés en cas d'exposition de longue durée à un certain nombre de métaux (cadmium, cuivre, plomb, zinc)(**Naithani et Kakkar, 2005**).

I.1.1.3-Impacts sur les organismes aquatiques

La contamination par des métaux peut avoir des effets toxiques sur la vie aquatique. A 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**).

I.2- Les bactéries et les métaux lourds

Une substance est dite toxique lorsqu'une fois mise en contact avec un organisme vivant, engendre une réaction spécifique ou un stress perturbant les fonctions physiologiques de l'organisme, accompagné d'effets néfastes touchant même leur descendance (**Wright et Welbourn, 2002**). **Gadd (1992)** définit la tolérance comme la capacité de faire face à la toxicité des métaux aux moyens des propriétés intrinsèques des organismes. En parallèle, il décrit la résistance comme la capacité à survivre aux métaux toxiques par des mécanismes de détoxification en réponse directe à la présence de métaux dans l'environnement (**Hobman et al., 2007**).

Les métaux essentiels participent au fonctionnement métabolique des cellules en tant que constituants d'enzymes ou constituants structurels (exemple de la membrane). La concentration et la spéciation du métal déterminent si celui-ci est utile ou nocif à la cellule. C'est pourquoi les bactéries ont développé différentes stratégies de défense pour se protéger contre la toxicité des métaux à savoir : Le

Synthèse Bibliographique

système d'efflux, l'imperméabilité, la séquestration, la bioaccumulation et la détoxification (Gadd et Smith, 2000; Pagès et al., 2007; Nies, 2003). Les déterminants génétiques impliqués dans ces mécanismes sont soit présents dans le génome de la bactérie, on parle alors de résistance intrinsèque (ou naturelle) (Lozniewski et Rabaud, 2010); soit acquis suite à un transfert horizontal (*via* des plasmides, des transposons et tout élément mobile) ou une mutation sélectionnées sous l'effet d'une pression de sélection, on parle alors de résistance acquise (Livermore, 2003).

I.2.1. Les Mécanismes de résistance aux métaux lourds

Les bactéries tolérantes aux métaux lourds ont développé divers mécanismes de résistance (Figure 2) qui sont codés par des gènes situés sur les chromosomes, les plasmides de tailles différentes, ou les transposons.

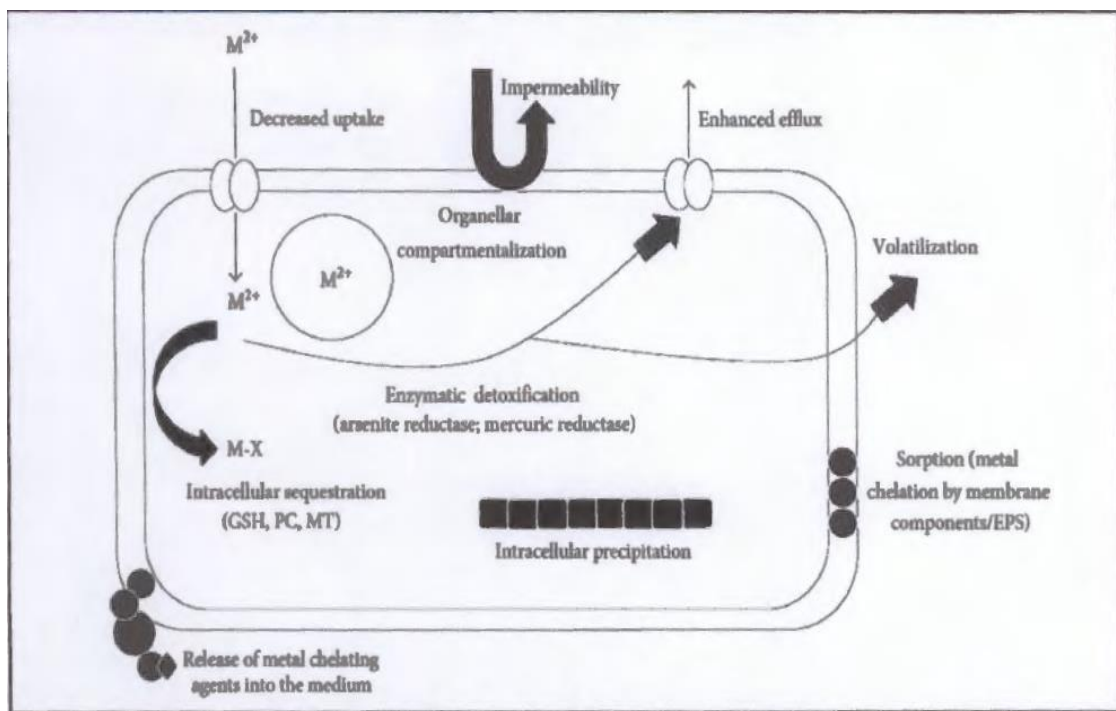


Figure 2. Exemples de quelques mécanismes de résistance bactérienne aux métaux lourds (Srivastava et Kowshik, 2013).

I.2.1.1. 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).

I.2.1.2. Séquestration

C'est la première ligne de défense pour immobiliser rapidement les métaux et éviter leur effet toxique, dans la cellule (intracellulaire) ou sur la surface externe de la membrane (extracellulaire).

I.2.1.2.1. 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), dont la principale fonction est de réguler les concentrations intracellulaires de certains métaux tels que le cuivre et le zinc (Nezengue, 2008).

Très peu de métallothionéines ont 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).

I.2.1.2.2. 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 et 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, la résistance aux antibiotiques, la capture des minéraux essentiels et des nutriments et la biosorption des métaux (Harrah *et al.*, 2006 ; Comte *et al.*, 2008; De Philippis *et al.*, 2011).

I.2.1.3. La conversion enzymatique: Détoxification

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**). Le cas le plus étudié est le mécanisme de détoxification du mercure codé par des éléments mobiles. Il consiste en la captation des ions mercure codé par des éléments mobiles. Il consiste en la captation des ions Hg^{2+} via la protéine périplasmique MerP et leur transport dans la cellule par la protéine MerT qui forme un canal dans la membrane interne, puis l'ion Hg^{+2} sera réduit dans le cytoplasme par MerA, en mercure métallique (Hg) non toxique et volatil (**Hobman et Brown, 1997**).

I.2.1.4. Système d'efflux

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 ; Boucharia, 2022**).

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 et Silver, 1995 ; Boucharia, 2022**).

I.2.1.5. Co-sélection de la résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques

Différentes études ont montré une corrélation positive entre la présence de métaux lourds dans un écosystème clinique ou environnemental et la résistance à la fois à ces métaux et aux antibiotiques chez les bactéries (**Perron et al., 2004 ; Baker Austin et al., 2006 ; Martinez et al., 2009**). Cette co-sélection peut être le résultat d'une co-résistance, d'une résistance croisée ou une co-régulation (Figure 3) (**Baker Austin et al., 2006**).

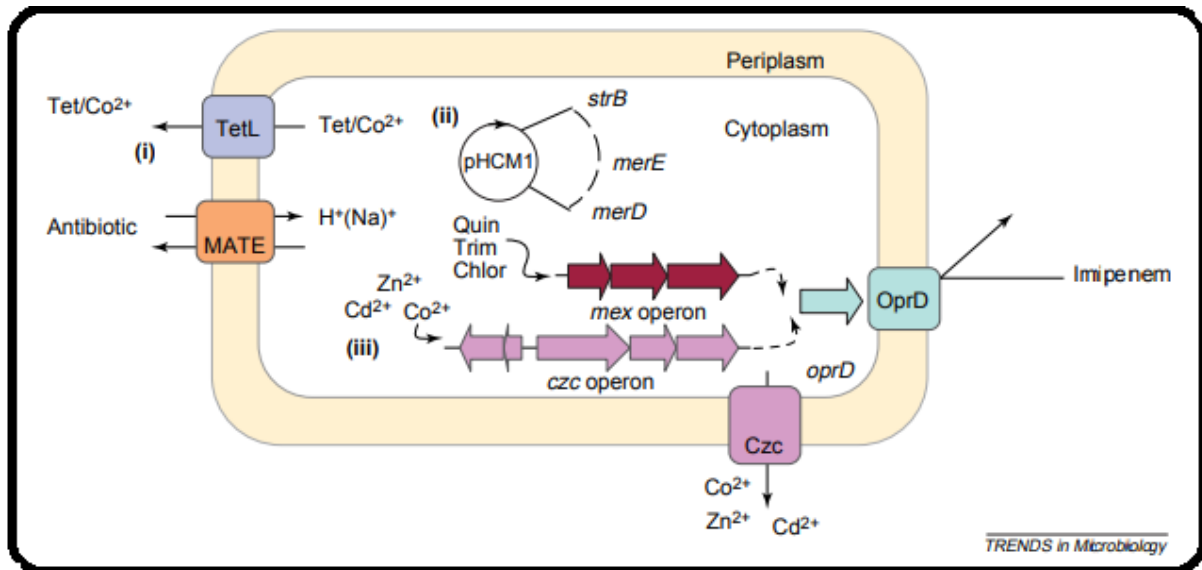


Figure 03 : Exemple de mécanismes de co-sélection de la résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques (D'après Baker-Austin et al., 2006). (i) : *résistance croisée* : le même système biochimique confère la résistance à l'antibiotique et au métal (tétracyclines et cobalt Co), (ii) *co-résistance* : présence des déterminants génétiques sur le même plasmide (exemple streptomycine strB et mercure mer), (iii) *co-régulation* : plusieurs systèmes de régulation sont liés sur le plan transcriptionnel. Exemple de l'opéron czc (résistance pour Co, Zn et Cd) et opéron mex oprD responsable de l'imperméabilité (quinolones, triméthoprime et chloramphénicol)

➤ **La co-résistance** : observée lorsque les déterminants génétiques de résistance aux métaux et aux antibiotiques sont portés par le même élément génétique mobile (plasmide, transposon, ..). Exemple connu, le transposon Tn21 qui porte l'opéron mer (résistance au mercure) et des gènes de résistance aux antibiotiques exemple aadA1 (résistance à la streptomycine) (Liebert et al., 1999, Baker-Austin et al., 2006).

➤ **La résistance croisée** : observée lorsque le même mécanisme de résistance permet à la fois la résistance à un métal et à un antibiotique. C'est notamment le cas de certaines pompes à efflux telle TetL qui confère la résistance à la tétracycline et au cobalt (Baker-Austin et al., 2006) et la pompe à efflux MexGHI-OpmD présente chez *P. aeruginosa*, qui permet la résistance au vanadium (V), à la tétracycline et à la ticarcilline + à l'acide clavulanique (Aendekerk et al., 2002).

➤ **La co-régulation**, quant à elle, s'observe lorsque la régulation d'un mécanisme, induite par la présence d'un métal ou d'un antibiotique, régule également un autre mécanisme, conférant les deux résistances (Perron et al., 2004, Baker-Austin et al., 2006). Perron et al., (2004) ont montré que des souches *P. aeruginosa* résistantes au Zn étaient également résistantes non seulement au Cd et au Co mais également à l'imipénème (Béta-lactamine). 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 (**Perronet al., 2004**).

I.3. Application des bactéries résistantes au traitement des eaux chargées en métaux lourds : Cas du chrome

Contrairement aux composés organiques, les métaux lourds persistent longtemps et ne peuvent pas être dégradés. La dépollution des sols ou des eaux implique des processus qui visent à réduire leur biodisponibilité (et donc leur toxicité), tout en évitant leur transfert vers les nappes phréatiques ou les chaînes alimentaires.

L'isolement de bactéries résistantes aux métaux lourds est la première étape vers la mise en place d'un procédé de dépollution (**Jones, 1998; Watanabe, 2001**). Ces micro-organismes sont capables de résister aux éléments toxiques auxquels ils ont été exposés. Ils peuvent être utilisés pour décontaminer les eaux contaminées par des procédés *in situ* ou *ex situ*, en les éliminant ou en les immobilisant (**Lovley et 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**).

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**).

Chez *Citrobacter*, ce 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 l'uranium pour la décontamination des solutions aqueuses (**Renninger et al., 2004**).

I.3.1. Traitement des eaux chargées par le chrome IV.

I.3.1.1. Le chrome, propriétés physicochimiques

Le chrome est un métal blanc, brillant et non magnétique, il appartient au groupe (VI-B) de la classification périodique des éléments de transition (**Shanker et al., 2005**). La spéciation du Cr(VI) et (III) dépend de plusieurs paramètres comme le pH et leur concentration.

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

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

La réduction du Cr(VI) peut avoir lieu en conditions standards en présence de fer ferreux Fe(II), de composés soufrés réducteurs ou de matière organique telles que les acides fulviques et humiques. La réduction peut être aussi photochimique ou biologique (**Losi et al., 1994**).

L'oxydation du Cr (III) est moins courante car elle exige la présence d'un couple de potentiel redox plus élevé que celui du couple Cr(VI)/Cr (III). Cependant, les concentrations de Cr (III) en solution sont quasiment nulles dans les conditions environnementales courantes car le chrome trivalent précipite presque complètement sous forme de $\text{Cr}(\text{OH})_3$ (**Pillai et Archana, 2012**).

I.3.1.2. Le chrome dans l'environnement

Le chrome est présent dans l'environnement de manière ubiquiste. Sa présence peut être d'origine naturelle ou le résultat des voies anthropiques. Il se retrouve dans divers milieux environnementaux, à la surface comme dans les eaux souterraines, l'eau de mer, le sol et les sédiments et l'air. Le chrome a été découvert en 1797 dans un minerai de plomb rouge en Sibérie par le chimiste français Nicholas Louis Vauquelin (**Shanker et al., 2005**). Les quantités de chrome détectées dans l'environnement sont liées pour l'essentiel à des émissions d'origine industrielle. Les déchets contenant du chrome sont considérés comme problématiques en raison de leur comportement dans les couches profondes du sol lorsqu'ils sont stockés dans des décharges. En milieu alcalin, on estime que la stabilité des chromates peut atteindre 50 ans, et qu'ils peuvent migrer vers les nappes aquifères, même au travers de sols cohérents. La combustion de boues contenant des composés chromiques doit être évitée en raison du risque de formation de chromates.

Synthèse Bibliographique

Dans les systèmes aquatiques, la toxicité des dérivés solubles du chrome varie en fonction de la température, du pH, de la dureté de l'eau ainsi que des espèces d'organismes aquatiques concernés. Les chromates ont une bonne solubilité dans l'eau, mais dans le milieu naturel, ils se transforment aisément, en présence de matières organiques oxydables, en composés de chrome(III), lesquels sont stables et de moindre hydro-solubilité

La concentration maximale acceptable dans l'eau potable est de 50 µg/L selon l'OMS (2004). Dans les eaux douces (rivières, lacs, eaux souterraines) : OMS IPCS (1988) : 1 à 10 µg/L.

I.3.1.3. Toxicité du chrome

Le chrome comme les autres métaux lourds est l'un des polluants les plus persistants dans l'environnement, sa présence dans l'air; le sol et l'eau est connue comme une source de menace croissante pour l'environnement et la santé humaine. Le chrome métal et le chrome trivalent ne sont pas toxiques. Cependant, et à cause de sa solubilité, le chrome hexavalent, qui se retrouve en interaction avec beaucoup d'organismes aquatiques et terrestres sans oublier l'homme, peut entraîner des inflammations des muqueuses et des ulcères, est cancérigène (Xu et al., 2014). Les organes où la concentration en chrome est la plus élevée sont le foie, les reins, la rate et les os (Kushwaha et al., 2012). Le chrome (VI) à également, un effet toxique sur les bactéries saprophytes et nitrifiantes; sur les champignons filamenteux, les algues et sur le phytoplancton par l'altération du matériel cellulaire, du métabolisme et des réactions physiologiques (Thatoi et al., 2014).

I.3.1.4. Elimination du chrome

I.3.1.4.1. Les techniques physico-chimiques

Plusieurs procédés ont été utilisés pour l'élimination et la récupération du chrome. Nous distinguons les procédés **physico-chimiques** représentés par : l'électro-osmose et la migration électrolytique (Pamukcu, 1992), les procédés membranaires : ultra et nanofiltration (Husnain et al., 2016), l'adsorption (Jain et al., 2010), l'échange d'ions et les résines (Li et Xue, 2001) et les procédés biologiques basés sur l'utilisation de microorganismes *in situ* ou dans un bioréacteur (Monachese et al., 2012).

I.3.1.4.2 Les procédés biologiques

Certaines bactéries peuvent réduire le Cr (VI) en aérobiose : ex *Thermus scotoductus* SA01. D'autres peuvent la réaliser en anaérobiose c'est le cas de *Aerococcus sp* (Srinath et al., 2001). Plusieurs études ont montré la capacité de souches à Gram négatif à réduire le Cr (VI) à savoir : *Providenciasp* (Thacker, 2006); *Serratiamarcescens* (Campos, 2005); *Pseudomonas putida* (Ishibashi, 1990); *Thiobacillusferrooxidans* (Sisti, 1996) et *Ochrobactrumintermedium* CrT-

Synthèse Bibliographique

1(Faisal, 2005) et d'autres à Gram positif tel que *Bacillus cereus* S-6 (Faisal, 2005) et *Nesterenkonia* sp MF2 (Amoozegar, 2007).

Si les déterminants génétiques de la résistance au chrome (gènes du système de transport du sulfate et gène de protéine d'efflux ChrA) sont assez bien connus, ceux de la réduction le sont beaucoup moins. Certains auteurs pensent que le déterminant est porté par un plasmide. Ce serait le cas pour *Pseudomonas mendocina* MCM B-180 (Dhakephalkar et al., 1996). Si les déterminants sont assez peu connus c'est aussi parce que les mécanismes de réduction du chrome sont nombreux et très diversifiés. Il peut s'agir d'une réduction directe (ou enzymatique); ou d'une réduction indirecte par l'intermédiaire de certains métabolites cellulaires. Il existe tout d'abord le cas particulier des bactéries sulfato-réductrices (BSR) qui réduisent le Cr(VI) avec de l' H_2S en condition anaérobie. L'hydrogénase permet d'oxyder H_2 en H^+ , les électrons cédés par l'hydrogène sont transférés au cytochrome C3 qui les cède alors au Cr(VI) au lieu de réduire le sulfite (réduction indirecte) (Barrera-Diaz et al, 2012).

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-LCVRM à l'ENSSMAL. Il a pour objectif l'évaluation de la résistance aux métaux lourds chez des bactéries isolées à partir de différents poissons et l'isolement et la caractérisation de ces dernières d'une part et l'application de certaines de ces bactéries dans le traitement des eaux contaminées par les métaux lourds et particulièrement le Chrome.

II.1-Les outils de travail

L'ensemble du matériel et consommables utilisé dans cette étude est listé dans le tableau 02

Tableau n° 02: Les outils de travail utilisés

Appareillages et Equipements	Consommables	Solution et réactifs
-Auto clave -Vortex -réfrigérateur -Balance analytique -pHmètre - Etuves -Plaque chauffantes - Plaques agitatrices -Bec bunsen -centrifugeuse -spectrophotomètre	- Sachets en plastique -Boites Pétri -mixeur -Portoirs -Marqueur et étiquettes -Tubes à essai -Pipettes Pasteur -Bécher -Papiers filtre -Flacons en verre -Pissette -Erlen Meyer -Poires -Barreaux magnétiques -Entonnoir -Burette -Anse de platine -Micropipettes -Eprouvette	- fuschine - lugol - Acétone - Violet de Gentiane - L'eau distillée stérile - Galeries Api20E - Alcool absolu - Gélose Mac conkey - Gélose Hektoen - Muller Hinton - BEA -gélose au cétrimide - huile de vasline -huile d'émersion -disques d'oxydase -antibiotiques en poudre -Acide sulfurique -diphényl-carbazide - K ₂ Cr ₂ O ₇ -CuSO ₄ -CdCl ₂ -ZnSO ₄ -HgCl ₂ -PbNO ₃ .

II.2- Echantillonnage et site d'études

Le travail a concerné l'étude de la résistance aux métaux lourds chez deux types de poissons : un pélagique qui est la Sardine « *Sardina Pilcardus* » et l'autre démersale qui est le rouget de vase « *Mullus barbatus* » provenant de la zone de Bouharoun. Trois échantillonnage ont été effectués les 23/02/2023 ,02/03/2023 et 04/03/2023

La zone de Bouharoun est une commune de la wilaya de Tipaza en Algérie, bouharoun est une petite ville côtière connue par son port et ses sardines, Le territoire de la commune de Bouharoun est situé au nord-est de la wilaya de Tipaza, à environ 20 km à l'est de Tipaza



Figure 04 :la localisation de la zone bouharoun

alger <http://www.lesoirdalgerie.com/articles/2011/08/01/print-16-120839.php>

Bou-Haroun	
Informations	
Pays	Algérie
Région	
Wilaya	Tipaza
Daïra	Bou Ismaïl
Code postal	42425
Population	9 922 hab. (2008)
Superficie	
Densité	hab./km ²
Nom des habitants	Bouharounais
Altitude	214 m
Point culminant	
Coordonnées (long/lat)	2°40'00"E - 36°37'00"N

Figure 05 : la carte de la zone bouharoun

⋮ <http://www.lesoirdalgerie.com/articles/2011/08/01/print-16-120839.php>

Matériel et Méthodes

➤ La sardine : *Sardina pilchardus*

La sardine est une espèce pélagique grégaire dont la répartition est conditionnée surtout par la température et notamment par la richesse en plancton, La sardine, *Sardina pilchardus*, est rencontrée en Atlantique Nord, en Méditerranée et en Mer Noire ; Généralement elle est présente à des profondeurs de 30 à 55 m la journée et remonte à 15 à 35m de profondeur la nuit

Les sardines se nourrissent de zooplancton, principalement de copépodes, cladocères, larves de crustacés, euphausidae (krill) et de phytoplancton. Ce dernier, représenté entre autres par des Diatomées, est surtout abondant dans les contenus stomacaux des larves et des jeunes individus (Sahnouni, 2012).

La position systématique du poisson est la suivante (Chlaida, 2009):

- Embranchement : Vertébrés
- Classe : Ostéichtyens
- Sous-classe : Actinoptérygiens
- Ordre : Clupéiformes
- Famille : Clupeidae
- Genre : *Sardina*
- Espèce : *Sardina pilchardus*



Figure 06: *Sardina pilchardus* (Benguendouz, 2017).

➤ Rouget de vase : *Mullus barbatus*

Mullus barbatus poisson démersal sur fonds de vase, de sable ou de gravier, et même rocheux du plateau continental et du bord du talus de 10 à 300 mètres (Djabali et al., 1993). Il est très fréquent en méditerranée.

En Algérie, Dieuzeid R., (1959) mentionne que le rouget de vase est commun sur les fonds vaseux jusqu'à 150 mètres de profondeur et se trouve également en bordure des prairies de zostères et de posidonies, il se nourrit de crustacés benthiques, de vers polychètes et de mollusques.

- Embranchement : Chordata

Matériel et Méthodes

- Classe : Actinopterygi
- Sous-classe : Teleostei
- Ordre : Perciformes
- Famille : Mullidae
- Genre : *Mullus*
- Espèce : *Mullus Barbatus*



Figure 07 : La morphologie de *Mullus barbatus*

Benguendouz, 2017

II.3-Préparation de la solution mère

25g de poisson lavé ont été mixés dans 225ml d'eau peptonnée tamponnée. Après une revivification de 10min, les dilutions de 10 en 10 ont été réalisées dans de l'eau peptonnée tamponnée (Delarras et al., 2010).

II-4-Evaluation de la résistance aux métaux lourds

Dans notre étude nous avons évalué la tolérance ou la résistance des bactéries à six métaux lourds choisis selon leurs utilisations, disponibilités, toxicité et importance. Il s'agit du (CuSO₄), (ZnSO₄), (CdCl₂), (HgCl₂), (K₂Cr₂O₇) et (PbNO₃) avec des concentrations finales respectives de 400 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml, 50 µg/ml, 1600 µg/ml et 3200 µg/ml. La préparation des boîtes a été réalisée selon la méthode de dilution en milieu gélosé (Macconkey pour les coliformes et Mueller Hinton pour la flore totale).

0.1ml de l'échantillon ou des dilutions a étéensemencé à la surface des milieux gélosés avec ou sans métaux lourds. Après une incubation à 37°C pendant 24 à 48h, la prévalence de la résistance aux métaux lourds a été déterminée comme suit :

Pour la flore totale :

Taux de résistance de la flore totale (%)= Nombre de bactéries sur boîte MH avec métaux/nombre de bactéries sur boîtes MH sans métaux*100

Pour les coliformes totaux :

Taux de résistance des coliformes (%) = Nombre de bactéries sur boîte Mckonkey /nombre de bactéries sur boîtes Maconkey sans métaux*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. Les cultures pures ont été conservées dans des tubes de conservation.

II.6-Identification des bactéries résistantes

L'identification des bactéries résistantes conservées s'est basée selon le cas sur les tests suivants :

II.6.1- La 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 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 d'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 : Galerie API20E

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**)

***La galerie Api20E** : Est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif, elle comporte 20 micro tubes contenant des substrats déshydratés. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se

Matériel et Méthodes

traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. la lecture de ces réactions se fait selon les recommandations du fournisseurs(**Figarella, J. 1998**).

*Test de l'oxydase

L'oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaîne d'oxydo- réduction pour catalyser la fixation de l' H_2 et des électrons sur l' O_2 . Sa recherche est basée sur l'oxydation de l'oxalate de diméthylparaphénylène diamine.

Le test a été réalisé à l'aide d'un disque de commerce prêt à l'emploi, imprégné d'eau distillée sur lequel a été déposée une colonie. La réaction positive (oxydation du substrat contenu dans le disque) se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée (**Delarras, 2007**).

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 étudiée en se référant au catalogue ou au logiciel d'identification « identification.xls »

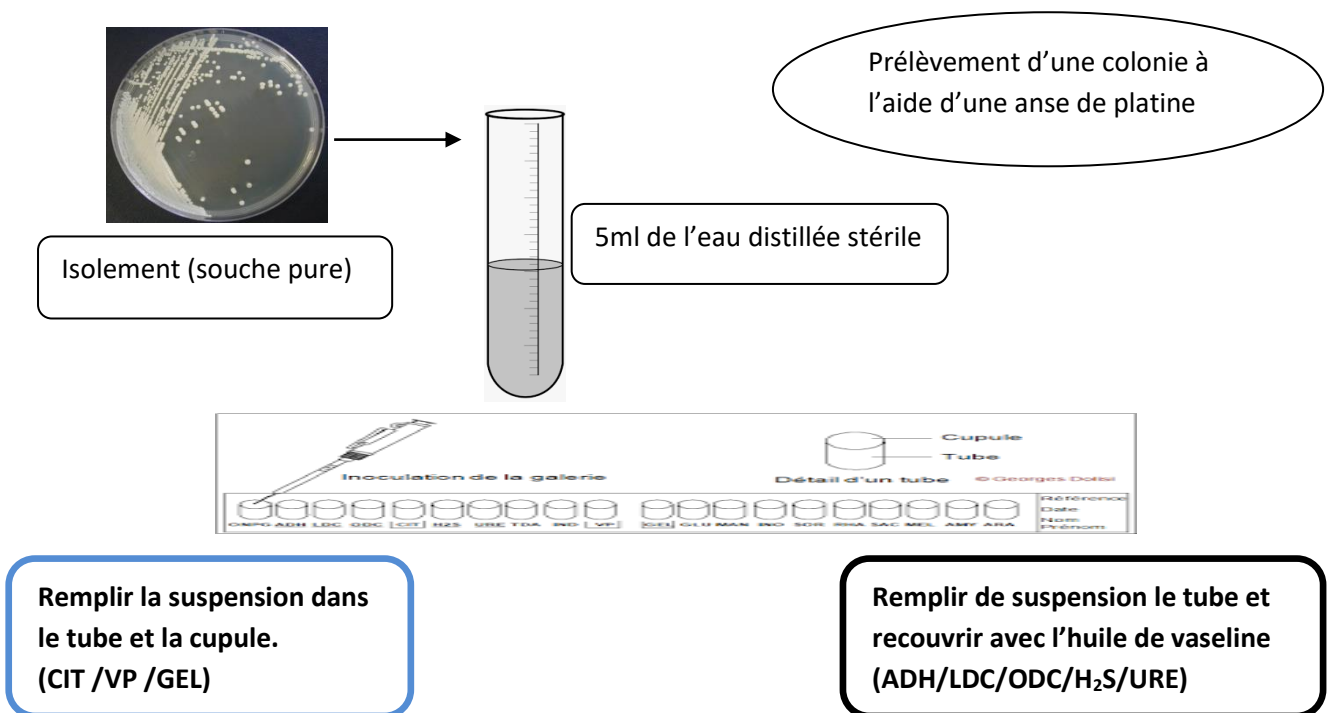


Figure 08: Identification biochimique Galerie API20E.

II.6.3-Identification des cocci à GRAM positif

6.3. Identification des cocci à GRAM positif

Matériel et Méthodes

Les cocci à Gram positif peuvent appartenir au genre *Staphylococcus* (catalase-positif), qui se présente sous forme de grappes, ou *Streptococcus* (catalase-négatif), qui se présente en chaînes (Sizar, Unakal, 2022).

6.3.1. Recherche des Staphylocoques sur Chapman:

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

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.

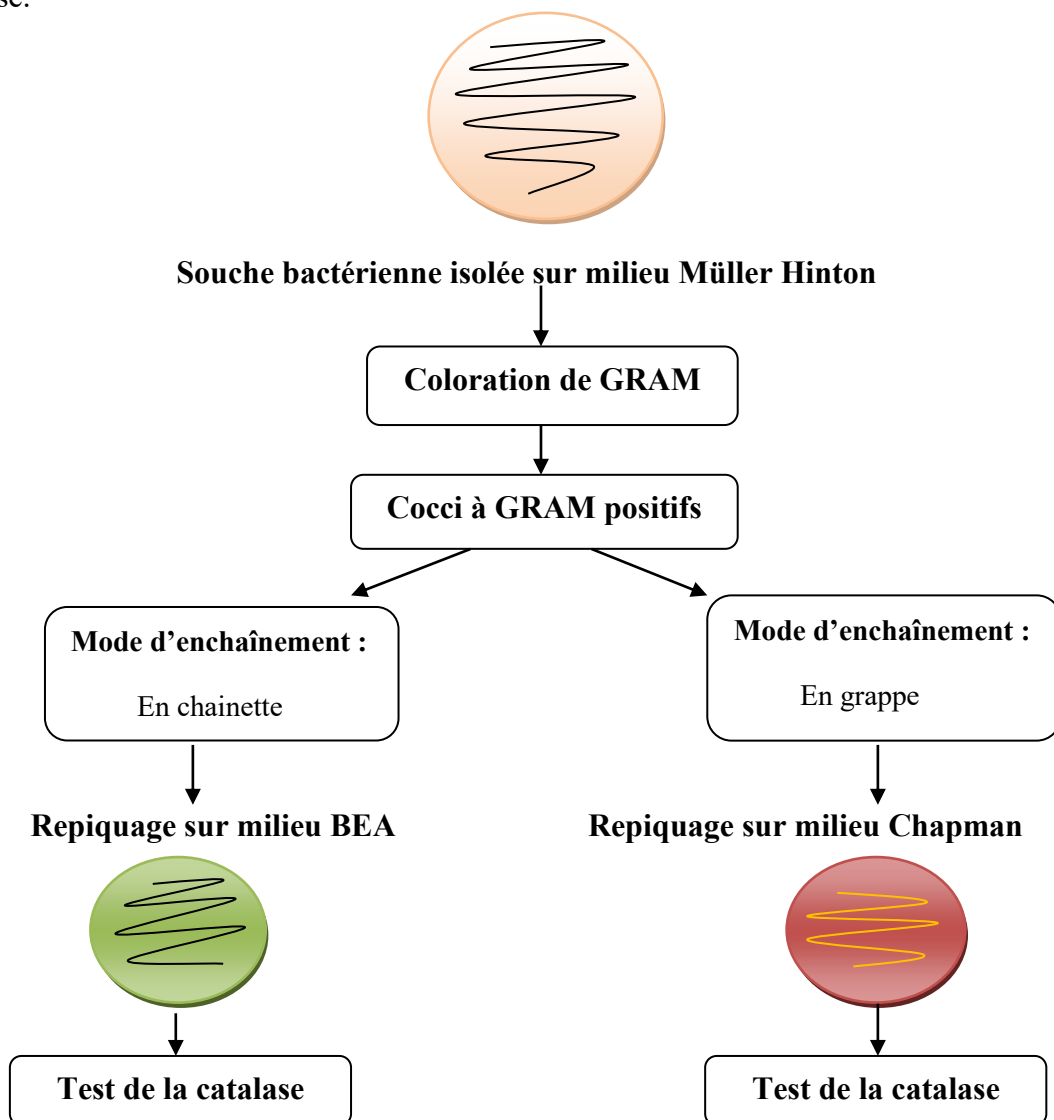
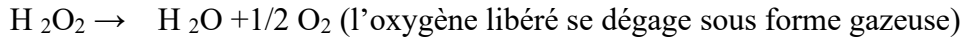


Figure 09:Schéma représentant les étapes d'identification des cocci à GRAM positifs.

II.6.3.3-Test de la catalase (Delarras, 2003).

Matériel et Méthodes

Cette enzyme empêche l'accumulation d'H₂O₂ et le dégrade selon la réaction suivante :



A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien et une goutte d'eau oxygénée. Un Dégagement immédiat de bulles gazeuses traduit la présence de la catalase.

II.7- Détermination du profil de résistance aux métaux lourds des souches bactériennes isolées par la méthode de dilution en milieu gélosé

Un inoculum de 2µl (dot) d'une culture jeune (10⁸cellule/ml) de la souche bactérienne à tester obtenue sur BHIB après une incubation de 24h à 37°C, est déposé à la surface de boîtes de MH additionnées de métaux lourds à des concentrations critiques : CuSO₄ (400µg/ml); CdCl₂(200 µg/ml); ZnSO₄(400 µg/ml); HgCl₂ (50 µg/ml); K₂Cr₂O₇ (1600 µg/ml); PbNO₃ (3200 µg/ml) puis incubé à 37°C pendant 24h.

Une croissance bactérienne indique la résistance de cette souche à la concentration des métaux lourds testés.

II.8-Détermination des résistances associées aux antibiotiques des souches bactériennes isolées.

Un inoculum de 2µl (dot) d'une culture jeune (10⁸cellule/ml) de la souche bactérienne à tester obtenue sur BHIB après une incubation de 24h à 37°C, est déposé à la surface de boîtes de MH additionnées d'antibiotiques à des concentrations critiques : (AMX : 8µg/ml); (CTX : 2µg/ml); (CAZ : 8µg/ml); (CIP : 0.5µg/ml); (Gen : 0.5µg/ml) et (RA : 16 µg/ml) puis incubé à 37°C pendant 24h.

La lecture est faite après 24h, une croissance bactérienne indique la résistance de cette souche à l'antibiotique utilisé.

II.9-Essais d'élimination du chrome par des souches résistantes aux métaux lourds (*Serratia odorefera*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*)

II.9.1-Détermination du profil de résistance au chrome des souches bactériennes isolées

Un inoculum de 2µl (dot) d'une culture jeune (10⁸cellule/ml) de la souche bactérienne à tester obtenue sur BHIB après une incubation de 24h à 37°C, est déposé à la surface de boîtes de MH additionnées chrome VI à des concentrations finales de: 100µg/ml, 500µg/ml, 1000µg/ml et 5200µg/ml et incubé à 37°C pendant 24h.

Une croissance bactérienne indique la résistance de cette souche au chrome.

II.9.2- L'application des souches pour l'élimination du chrome IV

Trois souches ont été retenues pour la suite du travail. Il s'agit de l'optimisation des paramètres physico-chimiques et biologiques qui influencent l'efficacité de l'élimination du chrome IV à savoir : la concentration initiale du Chrome VI, la quantité de l'inoculum et le pH du milieu.

II.9.2.1-Effet de la concentration initiale

Dans un volume de 150 ml de bouillon nutritif BHIB, une proportion de l'inoculum jeune de 1%, 5% et 10% du volume total des souches à tester a été additionnée au milieu contenant une concentration de Chrome VI de 100 mg/L et 200mg/ml à pH7 ainsi qu'un témoin sans chrome. Le milieu est incubé à 37°C avec agitation modérée pendant une durée de 120h. Des prélèvements de 10 ml sont réalisés dans le temps (t0, t24, t46, t69 et t120), afin de suivre la croissance microbienne à 600nm et la concentration du Chrome.

II.9.2.2-Effet de l'inoculum

Dans un volume de 150 ml de bouillon nutritif BHIB, une proportion de l'inoculum jeune de 1%, 5% et 10% du volume total des souches à tester a été additionnée au milieu contenant une concentration de Chrome VI de 100 mg/L et 200mg/L à pH7 ainsi qu'un témoin sans chrome. Le milieu est incubé à 37°C avec agitation modérée pendant une durée de 120h. Des prélèvements de 10 ml sont réalisés dans le temps (t0, t24, t46, t69 et t120), afin de suivre la croissance microbienne à 600nm et la concentration du Chrome.

9-2-3- Effet du pH

Dans un volume de 150 ml de bouillon nutritif BHIB, une proportion de l'inoculum jeune de 1%, 5% et 10% du volume total des souches à tester a été additionnée au milieu contenant une concentration de Chrome VI de 100 mg/L au pH5, pH7 et pH9 ainsi qu'un témoin sans chrome. Le milieu est incubé à 37°C avec agitation modérée pendant une durée de 120h. Des prélèvements de 10 ml sont réalisés dans le temps (t0, t24, t46, t69 et t120), afin de suivre la croissance microbienne à 600nm et la concentration du Chrome.

9-2-4- Dosage du Chrome

Les échantillons prélevés sont centrifugés pendant 10 min à 6000 rpm afin d'obtenir un surnageant exempt de cellules microbiennes (Amrik et Anshu, 2013). 5ml d'échantillon ou dilution ont été additionnés 4ml d'acide sulfurique 2N et 0,20 ml de la solution de diphenyl-carbazyde (0.5% P/V). Après 10min de réaction, l'absorbance de la couleur révélée est mesurée à 540nm.

Matériel et Méthodes

La détermination de la concentration du chrome se fait à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie (en annexe) préalablement pour différentes concentrations de chrome hexavalent allant de 0.2 à 1mg/l (APHA, 2005 ;CENTRE D'EXPERTISEQuébec, 2006)

Le taux de réduction du chrome (Tr) est calculé en utilisant la formule suivante (Pang et al, 2011) :

$$\text{Tr} = [(C_0 - C_t) / C_0] \times 100$$

C_0 : concentration initiale du Cr (VI)

C_t : concentration du Cr (VI) en temps t

t : temps d'incubation.

Chapitre III:

Résultats et Discussion

III.1.Prévalence de la résistance aux métaux lourds des bactéries isolées de la sardine et du rouget:

III.1.1. chez la flore totale

Les résultats obtenus pour les pourcentages de résistance aux métaux lourds chez la flore mésophile aérobie totale de la sardine (S) et du rouget (R) sont représentés dans la figure10.

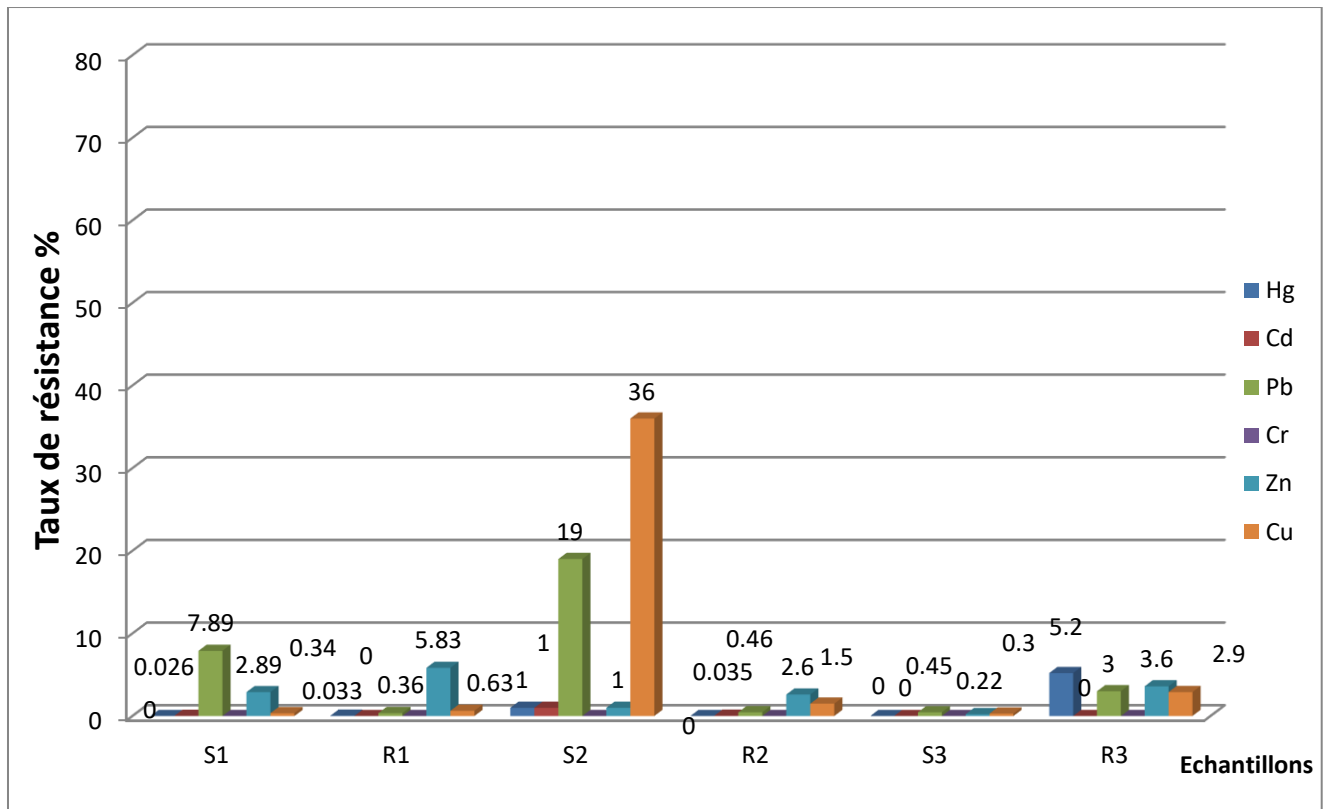


Figure 10: La résistance aux métaux lourds chez la flore totale de la sardine et du rouget. S1, S2, S3 : échantillons de sardine ; R1, R2, R3 : échantillon du rouget

Les résultats de la résistance aux métaux lourds chez la flore totale sont globalement faibles à moyennes.

Plomb :

Les valeurs élevées ont été observées pour le plomb chez la sardine (7.89, 19 et 0.45%) suivi du rouget (0.36, 0.46 et 2.3%). Cependant cette variation est statistiquement non significative ($p > 0.005$).

Cuivre :

Les taux de résistance au cuivre ont été, respectivement, de 0.34, 36, 0.3% et de 0.63, 1.5 et 2.9% pour la sardine et le rouget. Le taux le plus élevé a été observé pour le 2^{ème} échantillon de la sardine. Cependant, ces variations sont statistiquement non significatives ($p > 0.005$).

Zinc : Les taux de résistance au zinc ont été trouvés du même ordre chez les deux espèces. La sardine avec des taux de 2.89, 1 et 0.22% et le rouget avec des taux de 5.83, 2.6 et 3.6%. Ces petites variations sont statistiquement non significatives ($p>0.005$).

Cadmium : De très faibles taux de résistance au cadmium ont été observés à savoir 0.026, 1 et 0% chez la sardine et 0, 0.035 et 0% chez le rouget.

Mercure : Concernant le mercure, les taux de résistance ont été observés chez le rouget avec des taux de 0.033, 0 et 5.2% contre 0, 1 et 0% chez la sardine. Ces petites variations sont statistiquement non significatives ($p>0.005$).

Chrome : Les résultats ont montré l'absence totale de tolérance au chrome chez la flore totale de la sardine et du rouget.

Les résultats obtenus montrent des résistances aux Pb, Cu et Zn et faible à absente pour l'Hg, Cd et Cr au niveau des 3 échantillons étudiés. 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, nos résultats corroborent les résultats constatés pour la résistance aux métaux lourds au niveau des eaux de l'anse de kouali et fouka marine qui sont considérées à faibles activités anthropiques (**Touahir et al, 2023**). En effet, plusieurs auteurs ont rapporté une corrélation significative entre la résistance aux agents antimicrobiens dont les antibiotique et les métaux lourds et les apports anthropiques (**Alouache et al., 2011 ; Mudryk et al., 2010 ; Alam et al, 2020 ; Touahir et al, 2023**).

Bien que, le rouget est une espèce demersale en relation étroite avec les sédiments, caractérisée par sa faible mobilité et par sa nourriture riche en algues, polychètes, crustacés, gastéropodes et poissons et que la sardine est une espèce pélagique essentiellement planctonophage, sans contact direct avec les sédiments, les analyses statistiques ont démontré que les variations observées sont non significatives et que l'habitat n'influence pas sur le taux de résistance aux métaux lourds. Ce résultat corrobore ceux obtenus par **Touahir, (2017)** concernant la résistance aux antibiotiques chez la sardine et le rouget.

III.1.2- chez les coliformes

Les résultats obtenus pour les pourcentages de résistance aux métaux lourds chez les coliformes totaux sont représentés dans la figure.11.

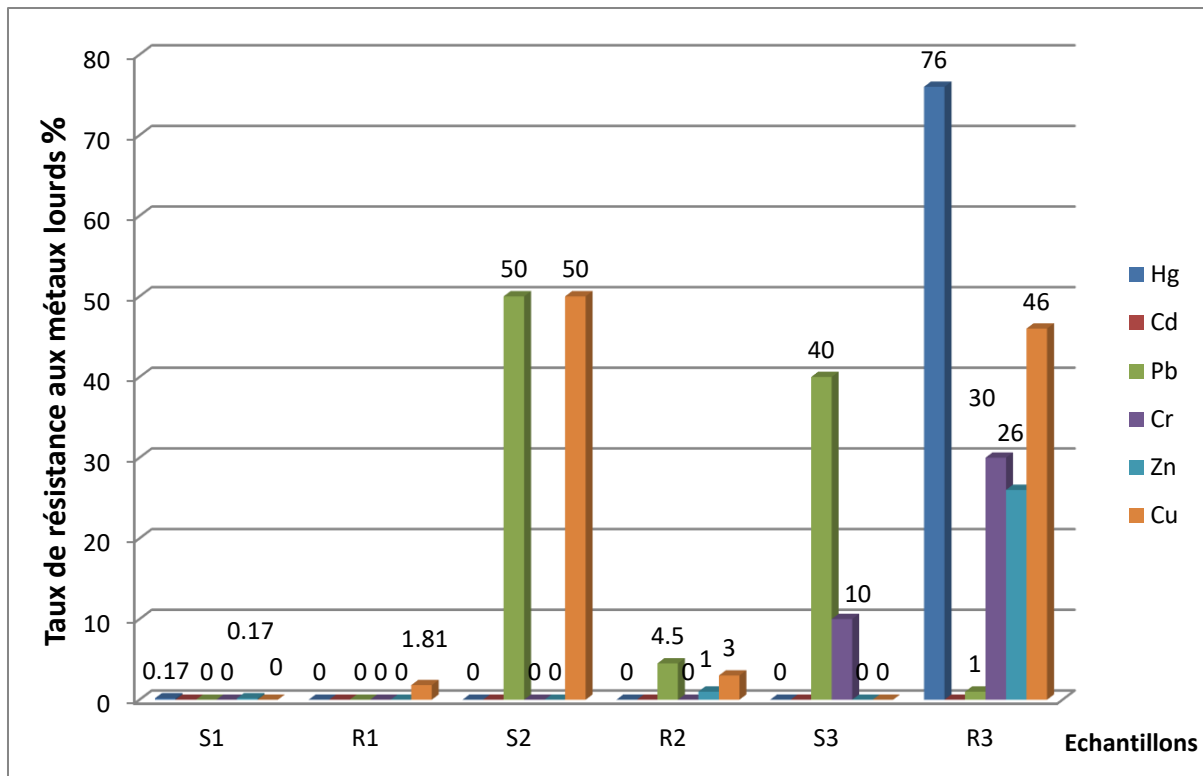


Figure 11: La résistance aux métaux lourds chez coliforme de la sardine et du rouget.
S1, S2, S3 : échantillons de sardine ; R1, R2, R3 : échantillon du rouget

Les résultats de la résistance aux métaux lourds chez les coliformes totaux montrent des taux globalement faibles à moyens à l'exception du troisième échantillon du rouget qui a montré la présence d'un taux important de coliformes résistants au Hg, Cu, Zn et Cr

Cuivre :

Les taux de résistance les plus élevés ont été observés pour le Cuivre avec des taux de 1.81, 3 et 46% pour le rouget et 0, 50, 0% pour la sardine. Statistiquement parlant, les résultats sont de même ordre pour les deux espèces étudiées.

Plomb :

Les valeurs élevées ont été observées pour le plomb chez la sardine (0, 50 et 40%) suivies du rouget (0, 4.5 et 1%). Cependant cette différence est statistiquement non significative ($p > 0.005$).

Zinc : Le taux de résistance au zinc a été trouvé élevé lors du troisième échantillon du rouget où un taux de 26% a été observé contre 0 et 1% pour le 1^{er} et 2^{ème} échantillon. Alors que les coliformes de la sardine ont présenté une sensibilité presque totale (0.17, 0,0%). Ces petites variations entre les deux espèces de poissons sont statistiquement non significatives ($p > 0.005$).

Mercure Concernant le mercure, les taux de résistance ont été nulles pour les deux espèces à l'exception du premier échantillon de la sardine (0.17%) et le 3^{ème} échantillon du rouget

(76%). Ces résultats obtenus pour les deux types de poissons sont statistiquement non significatives ($p > 0.005$).

Chrome Des taux de résistance moyens au chrome ont été observés lors du 3^{ème} échantillonnage de 10 et 30%, respectivement pour la sardine et le rouget. Alors qu'une sensibilité totale a été observée pour les autres échantillons. L'analyse statistique a révélé la différence non significative entre les deux espèces étudiées ($p > 0.005$).

Cadmium Les résultats ont montré l'absence totale de tolérance au cadmium chez les coliformes totaux de la sardine et du rouget.

L'analyse globale des résultats montre qu'à l'instar de la flore totale les taux de résistance au plomb sont observés et principalement chez la sardine, suivi du Cuivre. Cependant, cette variation est statistiquement non significative.

Les résultats ont également montré des taux de résistance très élevés parmi les coliformes totaux du 3^{ème} échantillon particulièrement celui du rouget.

III.2-Identification des souches résistantes isolées:

La coloration différentielle de Gram réalisée pour 40 souches résistantes a montré la présence majoritaire de bactéries à Gram négatif (25/40). Elles se présentent sous la forme de bacille, et des cocco-bacilles de différentes tailles. Seule 15 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 la figure 12 et le tableau n°03.

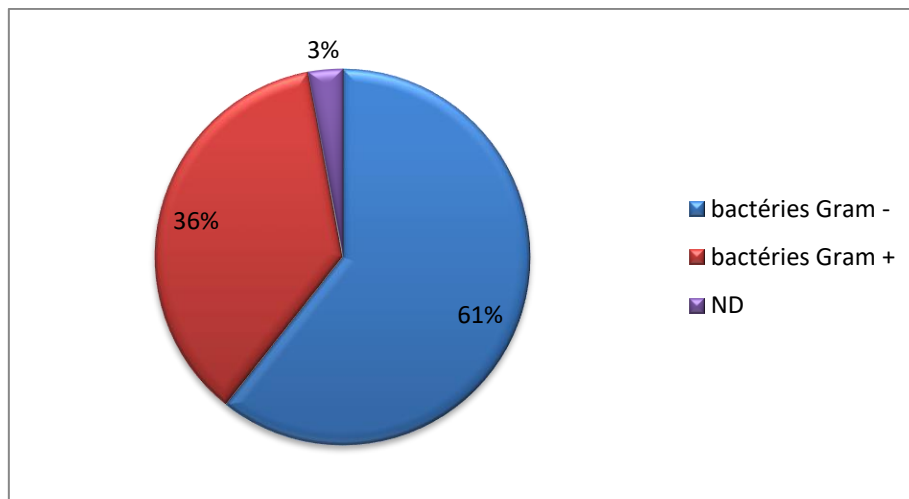


Figure12 : Répartition des bactéries résistantes aux métaux lourds selon le Gram

Tableau03 : Résultats de la coloration de Gram pour 40 souches résistantes aux métaux lourds isolées

Echantillons	Métal	Souche	Origine	Coloration de GRAM	Oxydase	
Echantillon 01	Cuivre	S4	Sardine	Bacille à Gram-	-	
		R4	Rouget	Bacille à Gram-	-	
		S5	Sardine	Bacille à Gram-	-	
		S20	Sardine	Cocci à Gram +	+	
		S3	Sardine	Bacille à Gram-	-	
	Chrome	S1	Sardine	Cocco-bacille à Gram+	+	
	Zinc	S13	Sardine	Bacille à Gram-	-	
		R13	Rouget	Bacille à Gram -	+	
	Plomb	S9	Sardine	Bacille à Gram-	-	
		R8	Rouget	Cocci à Gram+	+	
		R22	Rouget	Cocci à Gram-	-	
		R23	Rouget	Cocobacille à Gram-	-	
	Mercure	S18	Sardine	Bacille à Gram-	-	
		S19	Sardine	Bacille à Gram-	-	
		R19	Rouget	Bacille à Gram-	-	
	Cadmium	S16	Sardine	cocci à Gram+	+	
		S17	Sardine	cocci à Gram-	-	
		R24	Rouget	Cocci à Gram -	-	
	Echantillon 2	Zinc	R15	Rouget	Coccobacille à Gram-	-
		Cuivre	R2	Rouget	Bacille à Gram-	-
S7			Sardine	Cocco Bacille à Gram-	-	
S8			Sardine	Cocco bacille à Gram -	-	
Cadmium		R16	Rouget	Cocci e à Gram+	-	
Plomb		S10	Sardine	Cocco Bacille à Gram-	-	
		R6	Rouget	Cocco bacille à Gram +	-	
		R11	Rouget	Cocci à Gram +	-	
		S11	Sardine	Cocco bacille à Gram -	-	
R9	Rouget	Cocco bacille à Gram -	-			
Echantillon 3	Cuivre	R1	Rouget	Bacille à Gram-	-	
	Plomb	R5	Rouget	Cocco bacille à Gram -	-	

Résultats et Discussion

		R7	Rouget	Cocco bacille à Gram -	-
		R10	Rouget	Cocco bacille à Gram -	-
		S12	Sardine	Cocco bacille à Gram -	-
	Mercure	R21	Rouget	Cocci à Gram +	+
		R18	Rouget	Cocco bacille à Gram -	-
		R25	Rouget	Cocci à Gram -	-
	Cadmium	R17	Rouget	Cocco bacille à Gram -	-
	Zinc	R14	Rouget	Cocco bacille à Gram -	-
		R26	Rouget	Cocco bacille à Gram -	-
		S21	Sardine	Cocco à Gram -	-
		S15	Sardine	Coccobacille à Gram -	-

D'après nos résultats obtenus, on a remarqué que la plupart des bactéries résistantes aux métaux lourds testées sont à Gram négatif. Ces résultats corroborent ceux de **Duxbury (1981)** qui a signalé que généralement les espèces à Gram négatif isolées du sol semblent être plus tolérantes que les Gram-positif et ceux de **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 naturels pollués, que les bactéries résistantes étaient des bactéries à Gram négatif.

Afin d'identifier quelques espèces des bacilles à GRAM négatif résistants aux métaux lourds, le système de galerie API20E a été utilisé (Tableau04). Les résultats nous ont permis d'assigner quelques souches aux espèces suivantes : *Serratia odorifera* (n= 11), *Pseudomonas aeruginosa* (n=03), *Pseudomonas luteola* (n=03), *Proteus mirabilis* (n=1) , *Vibrio vulnificus* (n=1) , *Raoultella ornithinolytica* (n=3), *Kluyvera spp*(n=1), *Citrobacter koseri/farmeri* (n=1), *Leclercia.Adecarboxylata* (n=1)

Tableau04: Résultats de l'identification de 25 souches à Gram négatif résistantes aux métaux lourds par la galerie API20E

Référence	Origine E	Métal	Identification
R12	Rouget	Zn	<i>Pseudomonas luteola</i>
R19	Rouget E3	Zn	<i>Serratia odorifera 1</i>
S3	Sardine	Cu	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
S7	Sardine E2	Cu	<i>Serratia odorifera 1</i>
S4	Sardine	Cu	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
S8	Sardine E2	Cu	<i>Serratia odorifera 1</i>
R4	Rouget	Cu	<i>Pseudomonas luteola</i>
R1	Rouget E3	Cu	<i>Serratia odorifera 1</i>
R17	Rouget 3	Cd	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
S17	Sardine	Cd	<i>Proteus mirabilis</i>
S11	Rouget E2	Hg	<i>vibrio vulnificus</i>
R7	Rouget E3	Pb	<i>leclercia adecarboxylata</i>
R18	Rouget E3	Hg	<i>Pseudomonas luteola</i>
S18	Sardine	Hg	<i>Serratia odorifera 1</i>
S5	Sardine	Cu	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
S9	Sardine	Pb	<i>Raoultella ornithinoytica</i>
S13	Sardine	Zn	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
R19	Rouget	Hg	<i>Serratia odorifera</i>
R13	Rouget	Zn	<i>Citrobacter koseri /farmeri</i>
S15	Sardine E3	Zn	<i>Serratia odorifera</i>
S19	Sardine	Hg	<i>Serratia odorifera</i>
R15	Rouget E2	Zn	<i>Serratia odorifera</i>
S1	Sardine	Cr	<i>Kluyvera SPP</i>
R13- 1	Rouget	Zn	<i>Serratia odorifera</i>
S14	Sardine E2	Zn	<i>Serratia odorifera</i>

Concernant les souches à Gram positif, 3/17, ont été trouvés cocci à Gram positif 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 ont été assignées au genre *Enterococcus* ($n= 8$).

Le genre *Pseudomonas* est connu pour sa capacité à résister aux métaux lourds (Leedjaru et al., (1996). Plusieurs travaux ont également rapporté la tolérance des métaux lourds chez les entérobactéries isolées à partir de milieux aquatiques (Alam et al.,2020 ; Benhalima et al.,2020 ; Touahir et al.,2023) et de poissons marins (Ture et al.,2021). *L.Adecarboxylata* est une entérobactérie des milieux aquatiques décrit récemment comme un émergent pathogène opportuniste pour l'homme (Zayet et al., 2021). De même pour *V. fulnivicus* qui est considéré comme un pathogène pour l'homme et pour l'animal (Zayet et al.,2021).

III.3-Résultats des profils de résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques associés des souches bactériennes isolées

Les profils de résistance aux métaux lourds (Figure 13 et Tableau 05) ont révélé que la plupart des souches sont multi-résistantes à plus de 3 métaux à l'exception des souches résistantes au cuivre et au plomb qui ont montré un profil de deux métaux Cu-Pb (5) (2 rouget et 3 sardine). Nous avons remarqué que les souches résistantes au cuivre sont également résistantes au plomb et que la résistance au cuivre est associée à la résistance aux autres métaux. Des profils de résistance à trois métaux ont été observés chez la plupart des souches : Cu-Pb-Hg (7)(3sardine et 4 rouget), Cu-Pb-Cd(5)(3sardine et 2 rouget), Cu -Pb-Zn(5)(3sardine et 2 rouget), des profils à 4 métaux ont été observés : le phénotype Cu-Zn-Pb-Hg (9)(5 rouget et 4 sardine) étant le plus répandu parmi les phénotypes de résistance testés suivi de Cu-Hg-Pb-Cr (1) et de Cu-Zn-Cd-Pb (1). Six souches les plus multi-résistantes ont montré un profil de résistance à 5 métaux lourds Cu-Zn-Hg-Cd-Pb (4 rouget et 2 sardine).

16 souches résistantes aux métaux lourds ont été trouvées sensibles aux antibiotiques, alors que 23 souches ont été multirésistantes aux antibiotiques (bêta-lactamines, gentamicine, fluoroquinolones et la rifampicine). En effet, plusieurs travaux ont montré la résistance simultanée des souches aux métaux lourds et aux antibiotiques qui est généralement dû à :

- l'application des mêmes procédés de résistance à savoir le système d'efflux ou l'imperméabilité ou de régulation des métaux lourds et des antibiotiques (**Perron et al, 2004 ; Touahir et al, 2023**) :
- La présence des gènes de résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques sur le même déterminant génétique mobile (plasmide, transposon ou intégrons..) et la sélection d'un metal entrainera la sélection de l'antibiotique exemple le transposon Tn21 qui porte la résistance au mercure et à la streptomycine (**Liebert et al., 1999**).

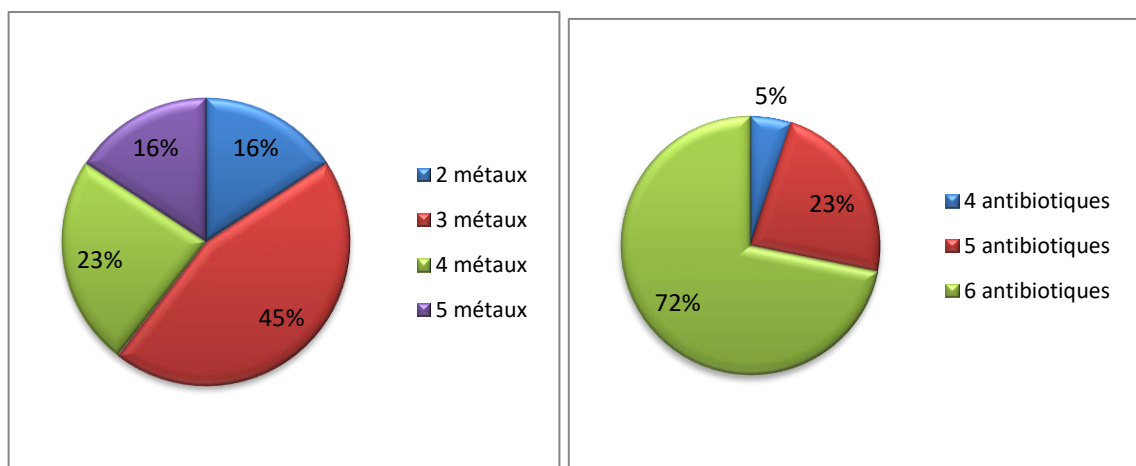


Figure.13 : la multi-résistance des souches aux métaux lourds. (A) métaux lourds, (B) antibiotiques

Résultats et Discussion

Tableau 05 : Profil de résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques associés chez les souches résistantes isolées

Métale	Référence	Origine	Isolats	Profil Métaux lourd(N de S)	Profil Antibiotiques (nombre de souche)
Cr	S1	Sardine E1	Kluyvera SPP	Cu-Hg-Pb-Cr (1)	AMX-CTX-CAZ-CIP-RA(1)
Cu	S2	sardine	ND	Cu -Zn -Hg -Cd -Pb (3)	AMX-CTX-CAZ-GM-CIP-RA (8)
	S3	sardine	Pseudomonas aeruginosa		
	R1	Rougé 3	Serratia odorifera 1		
	S4	SardineE1	Pseudomonas aeruginosa	Cu - Zn -Hg -Pb (2)	
	R2	RougetE2	ND	Cu -Cd-Pb (1)	
	S5	SardineE1	ND		
	R3	RougetE1	ND	Cu -Hg - Pb (1)	
	S6	SardineE1	ND	Cu-Pb (4)	
	S7	SardineE2	Serratia odorifera 1		
	S8	SardineE2	ND		
	R4	RougetE1	Pseudomonas luteola		
Pb	R5	Rouget E3	ND	Cu -Zn -Hg -Cd -Pb(2)	AMX-CTX-CAZ-GM-RA (1)
	R6	Rouget E2	ND	Cu - Zn -Hg -Pb(6)	AMX-CTX-CAZ-GM-CIP-RA (10)
	S9	Sardine E1	Raoultella ornithinoytica		
	S10	Sardine E2	ND		
	S11	Sardine E2	vibrio vulnificus		
	R7	Rouget E3	leclercia adecarboxylata		
	R8	Rouget E1	ND		
	R9	Rouget E2	ND		
	S12	Sardine E3	ND		
	R10	ROUGETE3	ND	Cu -Pb (1)	
	R11	Rouget E2	Staphylococcus aureus		
Zn	R12	Rouget	Pseudomonas luteola	Cu -Zn-Hg -Cd -Pb(1)	AMX-CTX-CAZ-CIP-RA (6)
	R13	RougetE1	Citrobacter koseri /farmeri	Cu -Cd-Pb-Zn (1)	
	S13	SardineE1	Raoultella ornithinolytica	Cu -Pb-zn (5)	
	S14	SardineE2	Serratia odorifera		
	S15	SardineE3	Serratia odorifera		
	R14	Rouget E3	Serratia odorifera 1		
	R15	RougetE2	Serratia odorifera		
Cd	S16	Sardine E1	Staphylococcus aureus	Cu -Cd-Pb (4)	AMX-CTX-CAZ-GM-CIP-RA
	S17	Sardine E1	Proteus mirabilis		
	R16	Rouget E2	Pseudomonas aeruginosa		
	R17	Rouget E3	Pseudomonas aeruginosa		
Hg	R18	Rouget E3	Pseudomonas luteola	Cu -Zn -Hg - Pb (1)	(10)
	S18	Sardine E1	Serratia odorifera 1	Cu -Hg -Pb (4)	
	S19	Sardine E1	Serratia odorifera		
	R19	ROUGET E1	Seeatia odorifera		
	R20	ROUGET E2	ND		
	R21	Rouget E3	Staphilococcus aureus	Cu - Zn -Hg(1)	

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 et Itskovich, 2014**). Des études antérieures avaient notées que les fréquences élevées de germes résistants aux métaux rencontrés dans un site donné sont liées aux pressions de sélection exercées par les métaux lourds au sein de ce site (**Al-Jebouri, 1985; Diaz-Ravina et al., 1994**).

Cette étude a montré que la souche de staphylocoque est une bactéries multi-résistante. Aussi, des études réalisées par **Fariaet 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 et aux métaux lourds. 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*, **Perronet 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 bêta-lactamines. 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**). Même effet sur la résistance à l'imipénème a été observé en présence du cuivre (**Caille et al.(2007)**).

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).

De plus, dans une étude de **Namadi et al (2016)**, il a été montré que la réduction des métaux lourds par chaque isolat bactérien dans les eaux usées d'une 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 cette raffinerie.

D'après ces résultats obtenus, des données sur l'état de la résistance aux métaux lourds retrouvées chez deux espèces de poissons très consommées en Algérie à savoir la sardine et le rouget de vase ont été obtenues. Ces données contribuent à la compréhension du maintien et de la dissémination de la résistance aux agents antimicrobiens en environnement et son impact sur la santé humaine et animale. Par ailleurs, ces bactéries multirésistantes peuvent avoir 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 rapporté par **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.

L'utilisation d'un consortium de culture mixte Consortium (MCC) de cinq bactéries tolérantes aux métaux lourds a montré la plus grande efficacité pour la réduction des métaux lourds dans les effluents industriels (Vitri et Giownnetti, 2008).

Dans cette optique la deuxième partie de ce travail consistera en l'application de certaines souches dans l'élimination d'une pollution métallique par le chrome.

Dans l'optique d'éliminer le chrome et d'autre pollution métallique, les souches résistantes ont été testées pour leur tolérance à différentes concentrations de chrome VI susceptibles d'être présentes dans les eaux industrielles à savoir 100-200-500 et 1000µg/ml(Zhao et al, 2012). Les résultats du tableau 7 ont révélé que 28/40 ont été tolérantes au chrome à différentes concentrations (100, 200 µg/ml) et avec une moindre croissance à 500 µg/ml à l'exception de 7 souches(4 *S.odorifera*, 2 *P. aeruginosa* et 1 *S. aureus*). Toutes les souches ont été sensibles à une concentration de 1000 µg/ml. En effet, ces espèces ont déjà été décrites tolérantes à ces concentrations de chrome dans les travaux de(Zhao et al, 2012).

III.4- Etude du potentiel des souches à l'élimination du Chrome et l'influence des différents paramètres.

Pour la suite de cette étude, Trois souches ont été retenues pour leur capacité à tolérer des concentrations élevées du Cr VI, à leur nature et leur abondance. Il s'agit de *P.aeruginosa* (R17), *S.odorifera* (R1) et *S.aureus*(S16) (Tableau 06).

La croissance des souches ainsi que le taux d'élimination du Chrome VI ont été estimés pour chaque souche dans un milieu fermé et dans différentes conditions expérimentales à savoir la présence ou non du chrome à différentes concentrations, la quantité initiale de l'inoculum et le pH du milieu. Les résultats seront présentés par souche et discutés globalement par la suite.

Tableau 06 : Résultats de la tolérance des souches aux différentes concentrations du Chrome IV

Code	Identification	Cr VI (100µg/ml)	Cr VI (200µg/ml)	Cr VI (500µg/ml)	Cr VI (1000µg/ml)
R1	<i>Serratia odorifera 1</i>	++	++	++	Absence
R12	<i>Pseudomonas luteola</i>	++	++	+	Absence
R5	ND	++	++	+	Absence
S2	ND	++	++	+	Absence
R17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	++	Absence
R16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	++	Absence
S9	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	++	++	+	Absence
S4	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	++	++	+	Absence
R8	ND	++	++	+	Absence
S10	ND	++	++	+	Absence
R7	<i>leclercia adecarboxylata</i>	++	++	+	Absence
S1	<i>Kluyvera spp</i>	++	++	+	Absence
R3	ND	++	++	+	Absence
S16	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	++	Absence
R13	<i>Citrobacter koseri / farmeri</i>	++	++	+	Absence
R10	ND	++	++	+	Absence
S14	<i>Serratia odorifera 1</i>	++	++	+	Absence
S19	<i>Serratia odorifera 1</i>	++	++	+	Absence
R19	<i>Serratia odorifera 1</i>	++	++	+	Absence
S18	<i>Serratia odorifera 1</i>	++	++	++	Absence
R15	<i>Serratia odorifera 1</i>	++	++	++	Absence
R14	<i>Serratia odorifera 1</i>	++	++	++	Absence
S7	<i>Serratia odorifera 1</i>	++	++	+	Absence
S8	ND	++	++	+	Absence
R11	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	Absence
S15	<i>Serratia odorifera 1</i>	++	++	+	Absence
S13	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	++	++	+	Absence

III.4.1. Cas de la souche *Serratia odorifera*R1

III.4.1.1. Effet de l'inoculum et de la concentration du CrVI sur la croissance microbienne

Le suivi de la croissance microbienne à une DO de 600nm durant 5jours (120h) dans des conditions différentes à savoir :absence et présence du Cr VI à 100 et 200mg/ml et en utilisant différentes quantités initiales de inoculum (1, 5 et 10%) (Figures 14a,b,c, 15a,b,c):

Résultats et Discussion

L'allure des courbes suit la cinétique de la croissance microbienne avec ses différentes phases (Leclerc,et *al.*,1999) : latence, exponentielle, stationnaire et parfois même déclin. En absence ou en présence du chrome, nous notons que plus la quantité de l'inoculum est grande plus le démarrage de la croissance est rapide (phase de latence parfois absente) et nous atteindrons la phase stationnaire plus rapidement. De plus, les courbes révèlent une croissance plus importante pour l'inoculum le plus élevée.

Peu importe la concentration de l'inoculum, la présence du chrome a un effet négatif sur la croissance microbienne, ceci est montré par la réduction de la valeur de DO obtenue en phase stationnaire qui était supérieure à 1.5 pour le témoin puis un max de 1.5 en présence de 100mg/l et à une DO max de 1 pour une concentration de 200mg/l, ce qui est clairement démontré dans les figures(15 a,b, c).

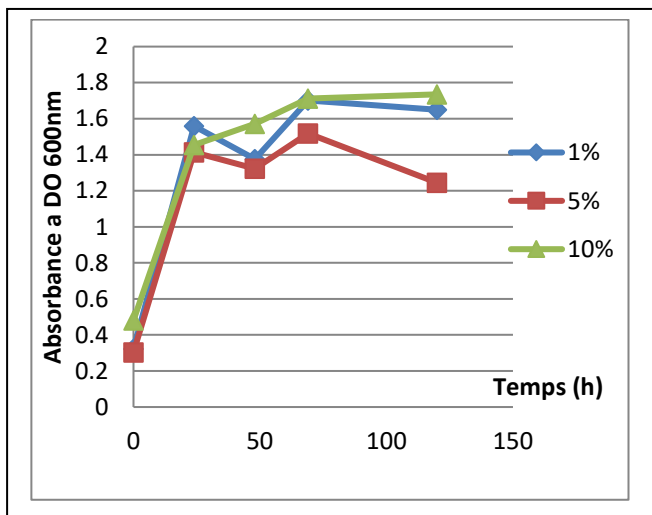


Figure 14a: Suivi de la croissance microbienne de *Serratia odorifera RI* à Do=600nm pour différents inoculum (1%,5%,10%) et en absence du chrome

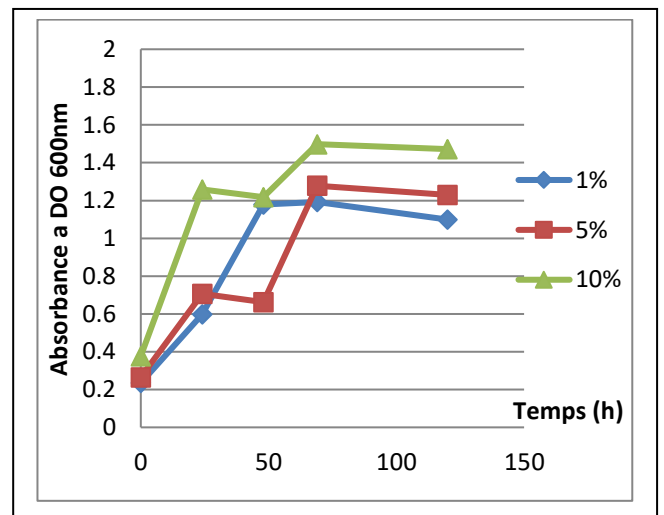


Figure 14b: Suivi de la croissance microbienne de *Serratia odorifera RI* à Do=600nm pour différents inoculum (1%,5%,10%) en présence de 100mg/l de chrome

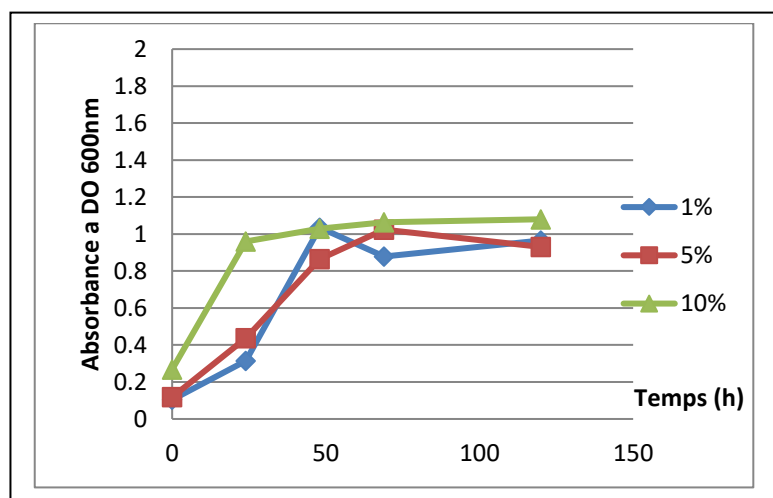


Figure 14c: Suivi de la croissance microbienne de *Serratia odorifera RI* à Do=600nm pour différent inoculum (1%,5%,10%) en présence de 200mg/l de chrome

Résultats et Discussion

Les croissances en présence de métaux sont faibles par rapport à celles des témoins, ce qui concorde avec les résultats obtenus par **Desaunay (2012)** sur le suivi de la croissance des cellules *d'Escherichia coli* K12Dh5α pour laquelle la présence du Zn et du Cd semble affecter la croissance de la bactérie en enregistrant de faibles taux de croissance par rapport au témoin.

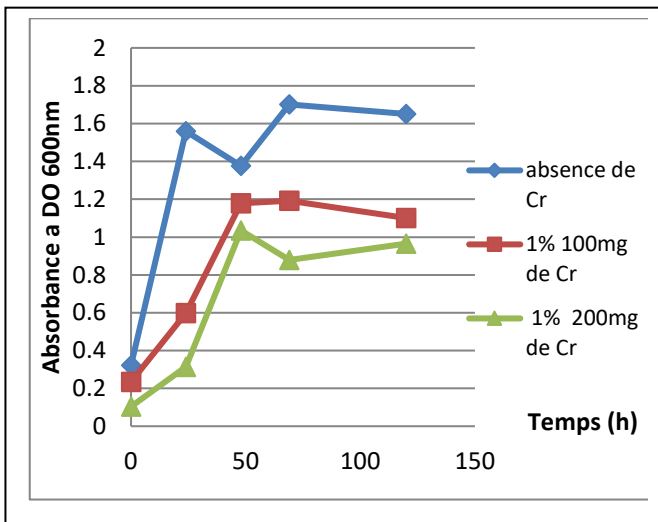


Figure 15a: Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de *S. odorifera* R1 à Do=600nm pour un inoculum de 1%

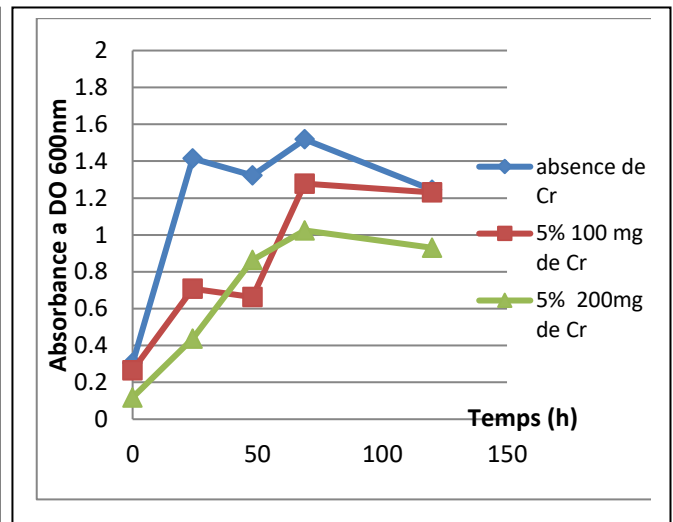


Figure 15b: Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de *S. odorifera* R1 à Do=600nm pour un inoculum de 5%

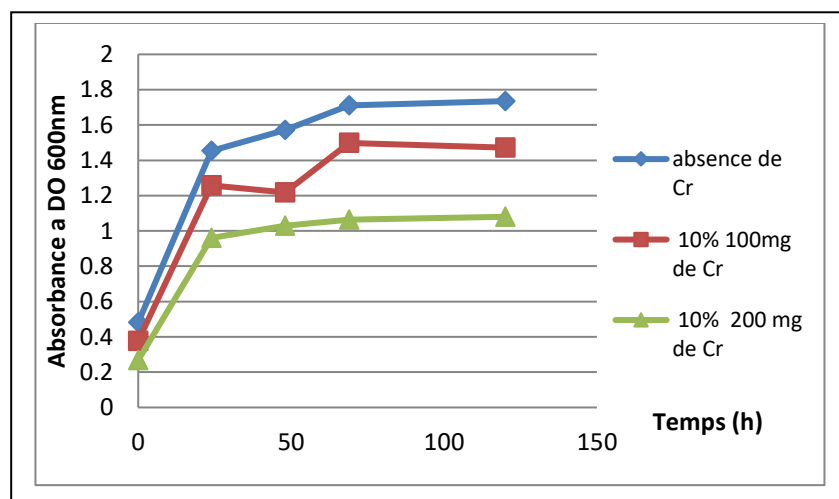


Figure 15c: Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de *S. odorifera* R1 à Do=600nm pour un inoculum de 10%

III.4.1.2. Effet de l'inoculum et de la concentration initiale du CrVI sur l'élimination du Chrome VI

Les figures 16a et 16b montrent le suivi de l'élimination du chrome dans le milieu lors de l'utilisation de différents inoculum (1%,5%,10%) et une concentration initiale de 100 et 200mg/ml CrVI.

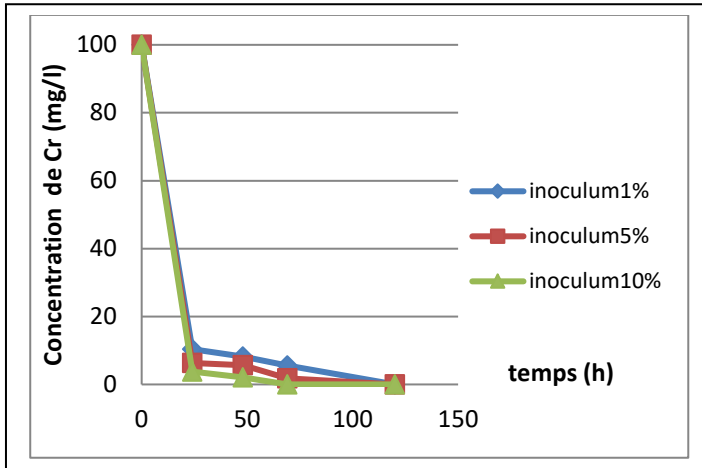


Figure 16a : suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 100mg/l par *S. odorifera* R1 à différentes concentrations de l'inoculum

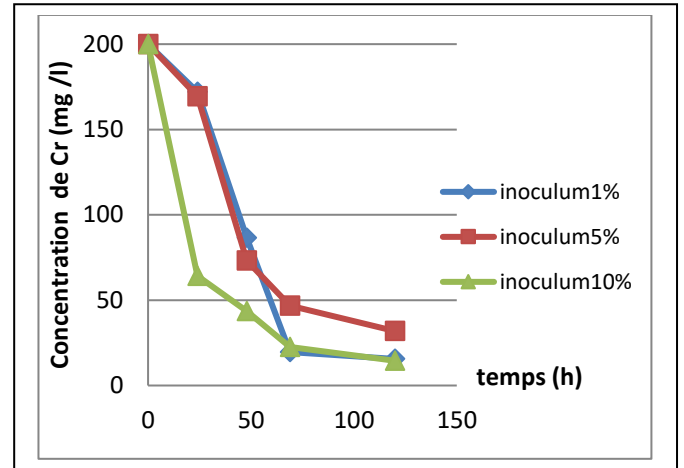


Figure 16 b : suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 200mg/l par *S. odorifera* R1 à différentes concentrations de l'inoculum

L'élimination du chrome suit la courbe de croissance. Pour une concentration de 100mg/l, l'élimination se fait dans les 24h peu importe la quantité initiale de l'inoculum. Par contre pour 200mg/l, l'élimination suit la croissance, un pourcentage important en phase exponentielle puis un ralentissement en phase stationnaire. Un taux d'élimination final de 92.21 et 92.72% pour l'inoculum 1 et 10%, respectivement et 84.06% à 5% d'inoculum. Par ailleurs, un taux de 67.29% d'élimination est observé en 24h pour un inoculum de 10% alors qu'il n'est que de 13.95 et 15.31% respectivement pour 1 et 5%.

III.4.1.3. Effet du pH sur la croissance et sur l'élimination du chrome

L'effet du pH a été testé sur la capacité de la souche à éliminer 100mg/l de CrVI en utilisant plusieurs concentrations de l'inoculum (1%,5% et 10%). Les résultats représentés dans les figures (26 a,b,c) ont révélé qu'en absence ou en présence du Chrome, la souche a une meilleure croissance à pH9 et une faible croissance à pH5 et cet impact est bien observé lors de l'utilisation d'un inoculum de 1%.

L'élimination du Chrome suit également la croissance microbienne avec une élimination presque totale à pH 7 et 9 en 24h quelque soit l'inoculum initial. Cependant, pour le pH5, nous constatons que plus la quantité initiale est élevée, plus l'élimination du Cr en 24h diminue 90.68, 77.91 et 60.52% respectivement pour 1, 5 et 10% d'inoculum.

Résultats et Discussion

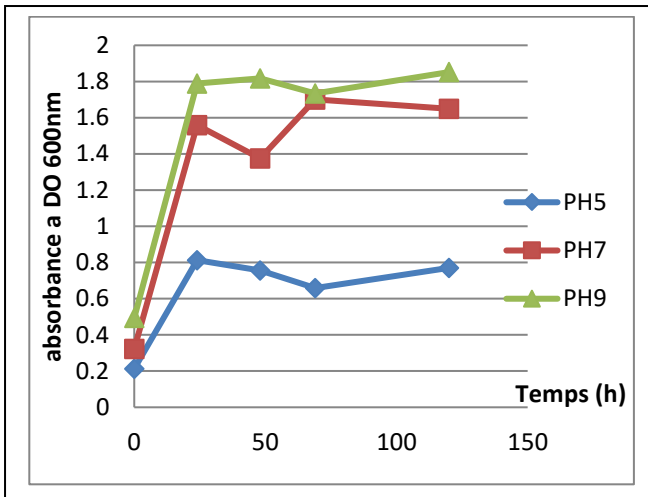


Figure18a: Effet du pH sur la croissance microbienne de *S.odorifera* R1 en absence de chrome et un inoculum de 1%

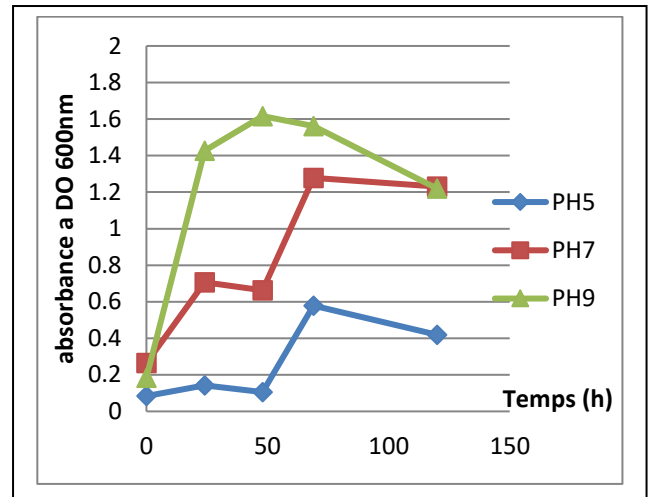


Figure17a: Effet du pH sur la croissance microbienne de *S.odorifera* R1 en présence de 100mg/l de chrome et un inoculum de 1%

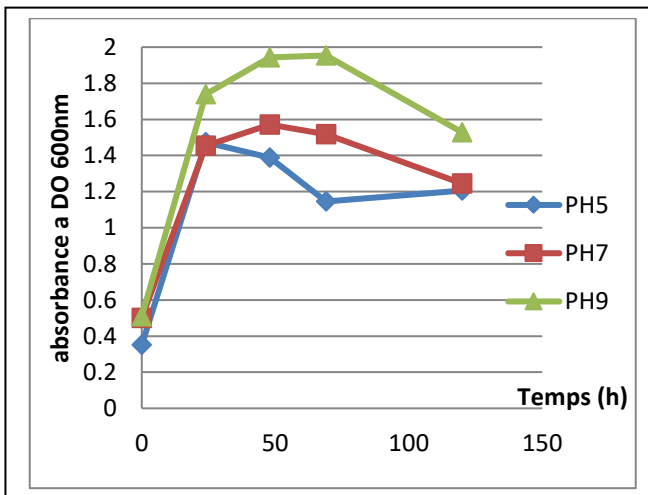


Figure18b: Effet du pH sur la croissance microbienne de *S.odorifera* R1 en absence de chrome et un inoculum de 5%

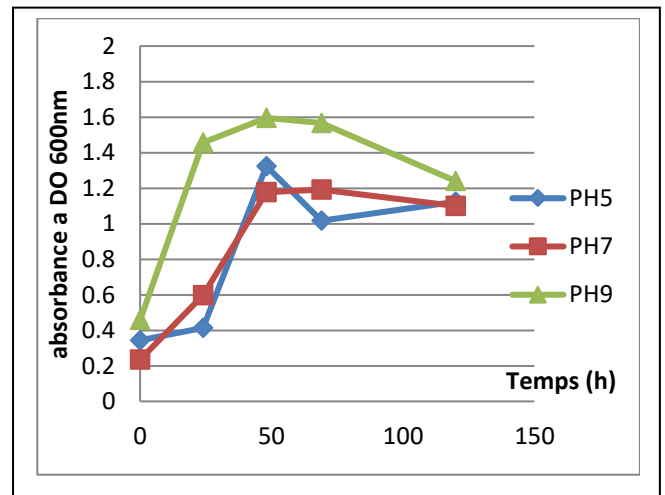


Figure 17b: Effet du pH sur la croissance microbienne de *S.odorifera* R1 en présence de 100mg/l de chrome et un inoculum de 5%

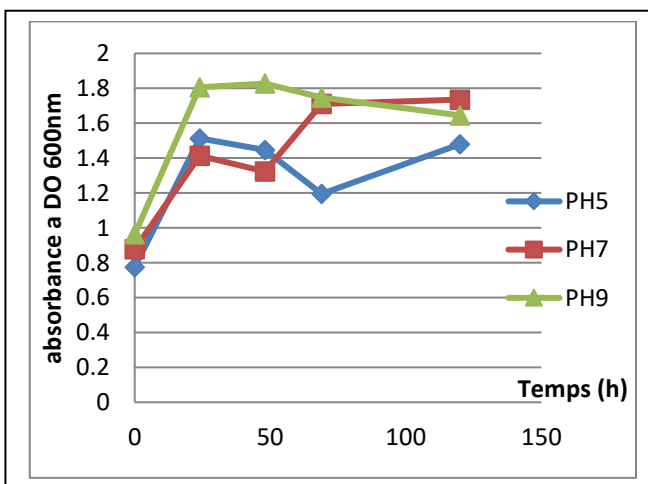


Figure18c: Effet du pH sur la croissance microbienne de *S.odorifera* R1 en absence de chrome et un inoculum de 10%

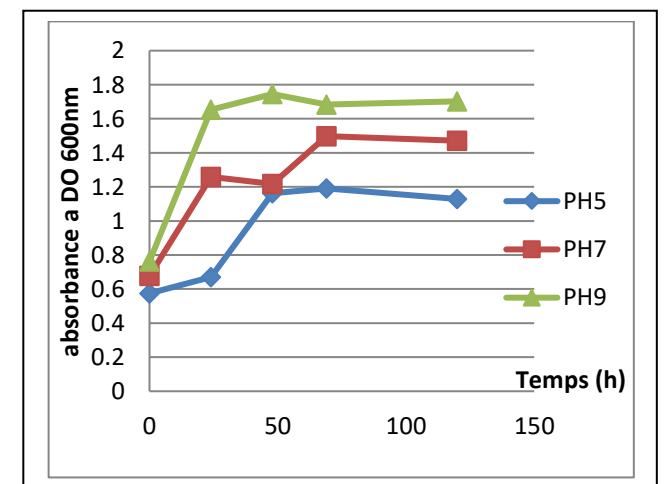


Figure 17c: Effet du pH sur la croissance microbienne de *S.odorifera* R1 en présence de 100mg/l de chrome et un inoculum de 10%

Résultats et Discussion

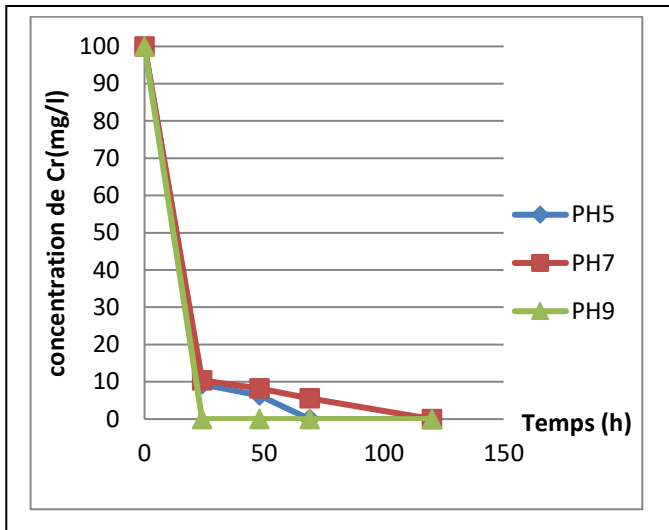


Figure19a: Effet du pH sur l'élimination de 100mg/l de chrome en présence d'un inoculum de 1%

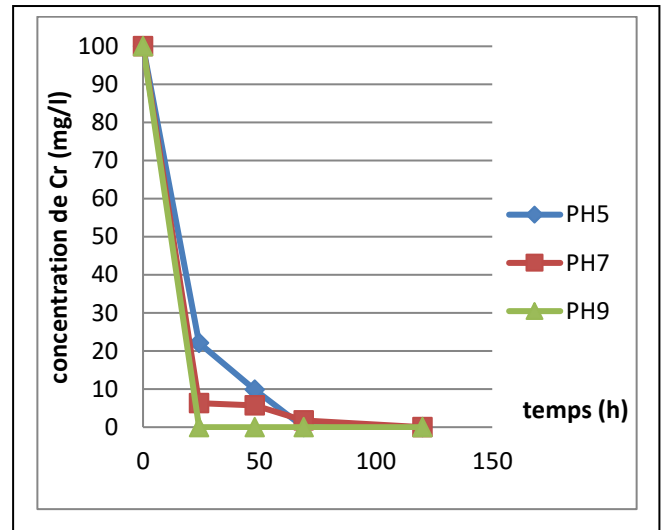


Figure19b: Effet du pH sur l'élimination de 100mg/l de chrome en présence d'un inoculum de 5%

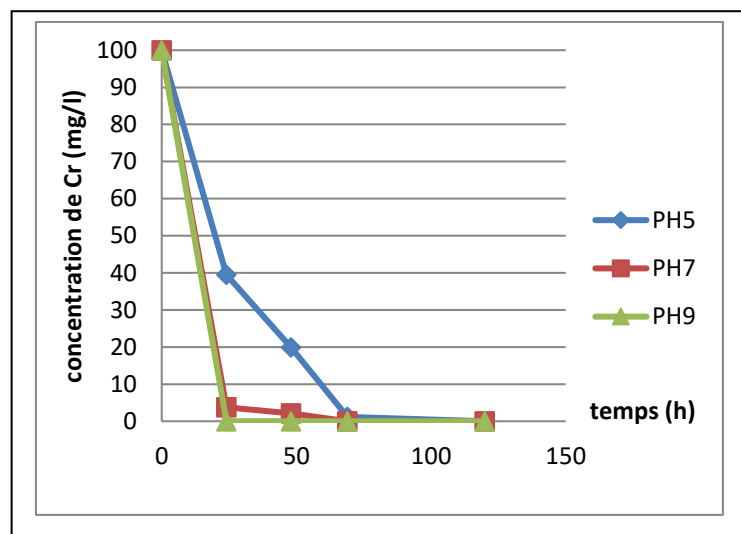


Figure19c: Effet du pH sur l'élimination de 100mg/l de chrome en présence d'un inoculum de 10%

III.4.2. Cas de la souche *Pseudomonas aeruginosa* R17

III.4.2.1. Effet de l'inoculum et de la concentration du CrVI sur la croissance microbienne

Le suivi de la croissance microbienne de la souche *Pseudomonas aeruginosa* R17 à une DO de 600nm durant 5 jours (120h) pour différentes concentration de l'inoculum et différentes concentrations du Cr VI (100 et 200mg/ml) a montré les résultats suivants (figures 20 a,b,c et 21a,b,c): La croissance de la souche *P. aeruginosa* R17 est de même grandeur que celle de *S. odorifera*. Nous notons que plus l'inoculum est élevé plus la croissance est meilleure. En absence de Chrome, la phase stationnaire est atteinte au bout de 24h alors qu'en présence de Cr, cette phase est atteinte dans les 48h et le maximum de croissance diminue au alentour de 1.6, 1.3 et 1.2 pour 10%,5% et 1% d'inoculum.

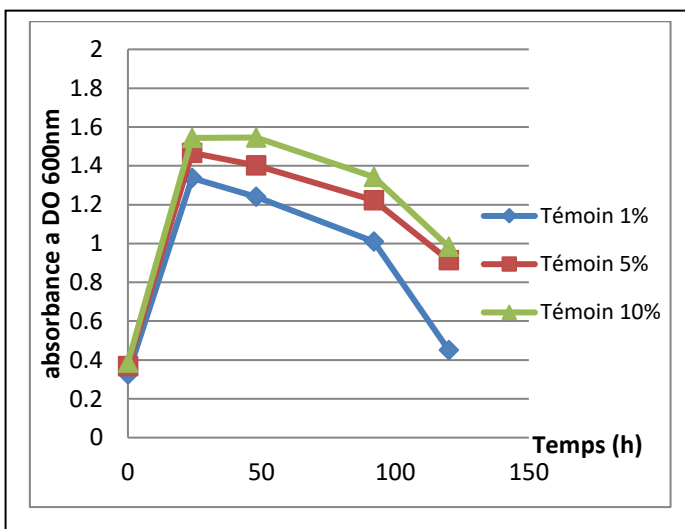


Figure20a : Suivi de la croissance microbienne de *P. aeruginosa* (R17) à Do=600nm pour différentes concentration d'inoculum et en absence du chrome

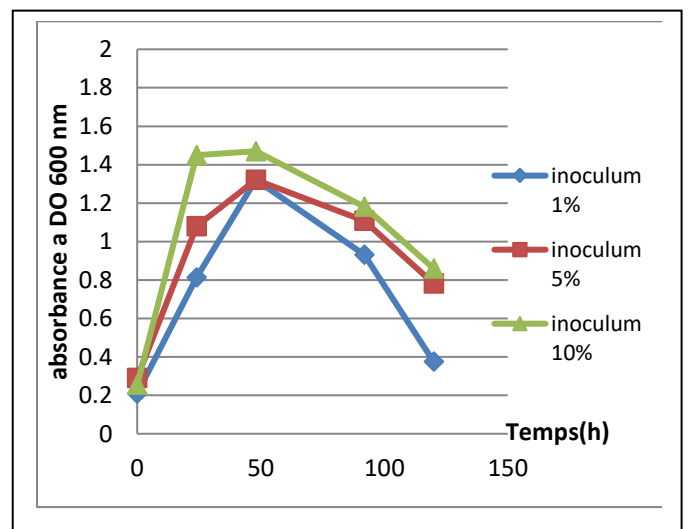


Figure20b : Suivi de la croissance microbienne de *P. aeruginosa* (R17) à Do=600nm pour différentes concentration d'inoculum et en présence de 100mg/l de chrome

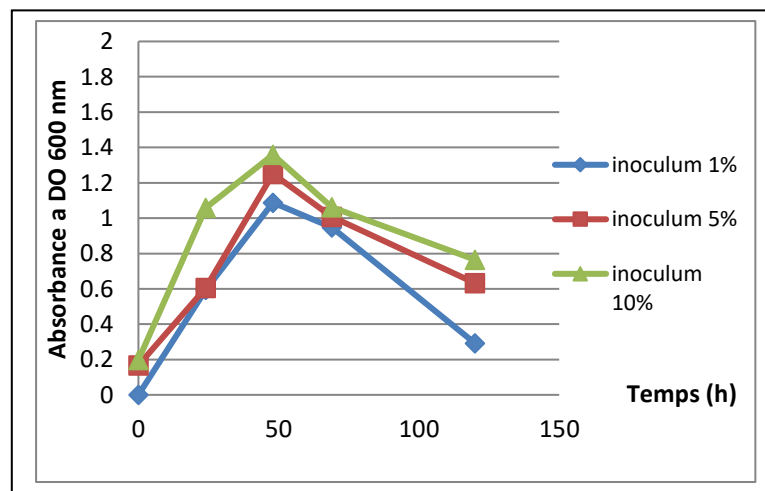


Figure 20 c: Suivi de la croissance microbienne de *P. aeruginosa* (R17) à Do=600nm pour différentes concentration d'inoculum et en présence de 200mg/l de chrome

Résultats et Discussion

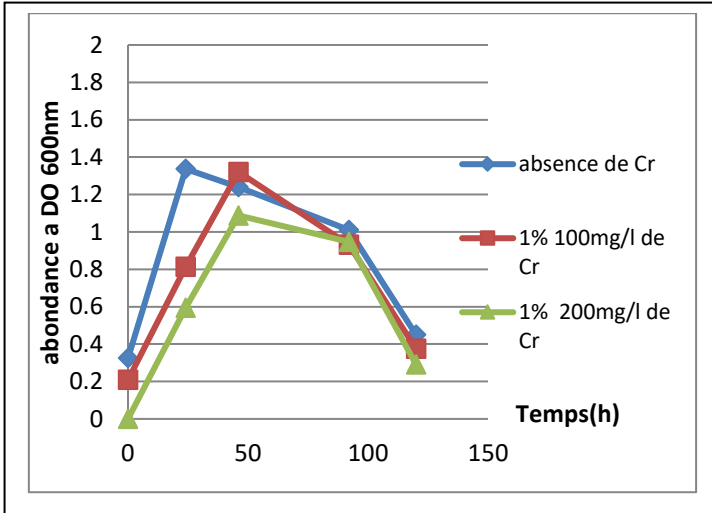


Figure 21a : Effet de la concentration initiale du chrome sur la croissance microbienne de *P. aeruginosa* (R17) à Do=600nm pour un inoculum de 1%

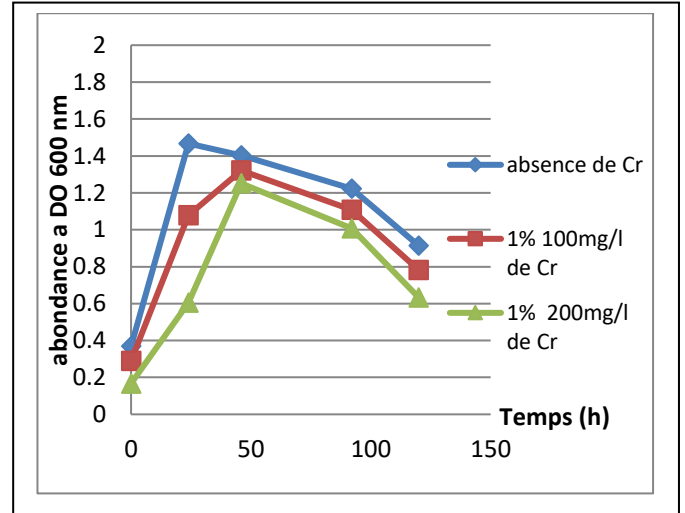


Figure 21 b : Effet de la concentration initiale du chrome sur la croissance microbienne *P. aeruginosa* (R17) à Do=600nm pour un inoculum de 5%

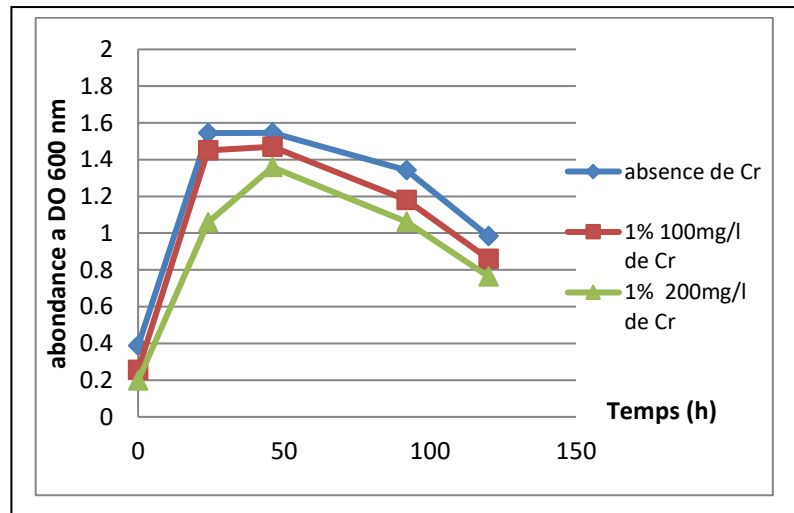


Figure 21c : Effet de la concentration initiale du chrome sur la croissance microbienne de *P. aeruginosa* (R17) à Do=600nm pour un inoculum de 10%

III.4.2.2. Effet de l'inoculum et de la concentration initiale du CrVI sur l'élimination du Chrome VI

Les figures 22a et 22b montrent le suivi de l'élimination du chrome dans le milieu lors de l'utilisation de différents inoculum (1%,5%,10%) et une concentration initiale de chrome de 100 et 200mg/ml. Les résultats ont montré l'élimination de 100mg/l en 24h quelque soit l'inoculum. Alors que pour 200mg/l, une élimination de plus de 90% est obtenues à 70h alors qu'en 24h seul l'inoculum 10% a permis l'élimination de 50% de Chrome.

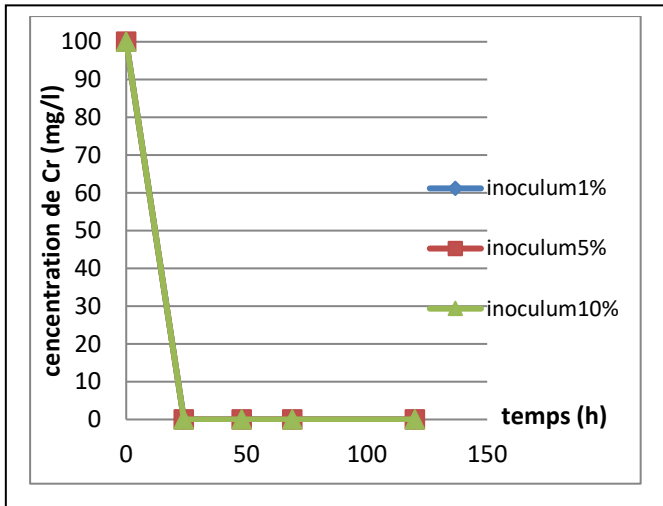


Figure 22a : Suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 100mg/l par *P. aeruginosa* (R17) à différentes concentrations de l'inoculum

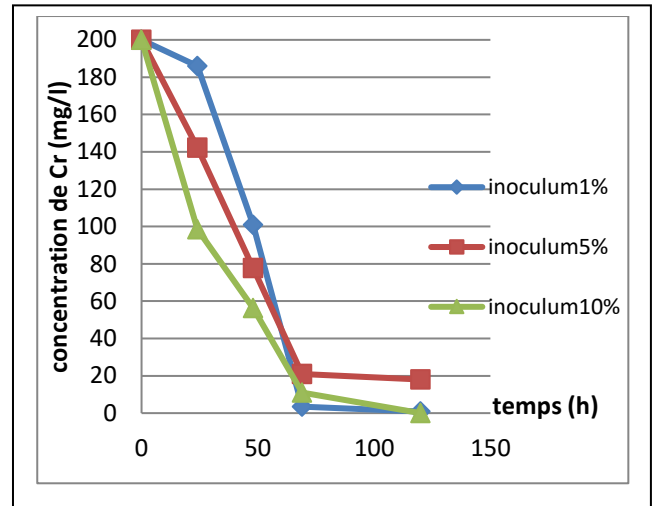


Figure 22b : Suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 200mg/l par *P. aeruginosa* (R17) à différentes concentrations de l'inoculum

III.4.2.3. Effet du pH sur la croissance et sur l'élimination du chrome

En absence de chrome, *P.aeruginosa* R17 a une croissance sensiblement la même, mais avec un ordre pH9, 7 et 5. Cet effet est constaté plus pour l'inoculum 10%. En présence de chrome, nous constatons que la croissance microbienne diminue par rapport au témoin principalement avec l'augmentation de l'inoculum. De plus, la croissance de la souche à pH 5, en présence du chrome, est très faible par rapport au témoin. Concernant l'élimination du chrome, peut importe le pH un taux de 100% d'élimination est observé en 24h (figure 23a,b,c)

Résultats et Discussion

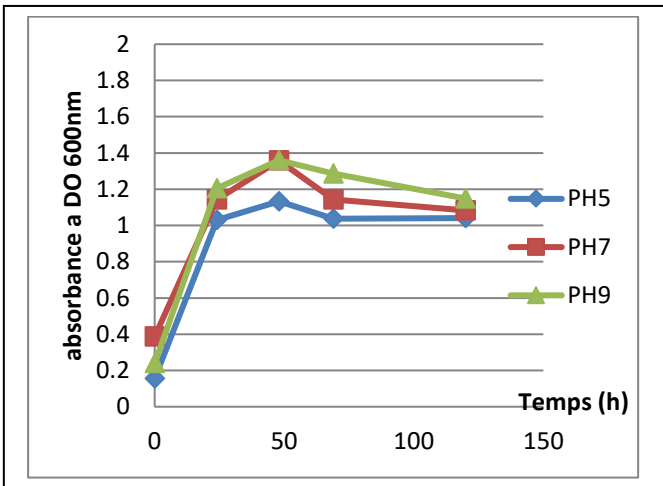


Figure23a : Effet du pH sur la croissance microbienne de *P. aeruginosa* (R17) en absence de chrome et en utilisant un inoculum de 1%

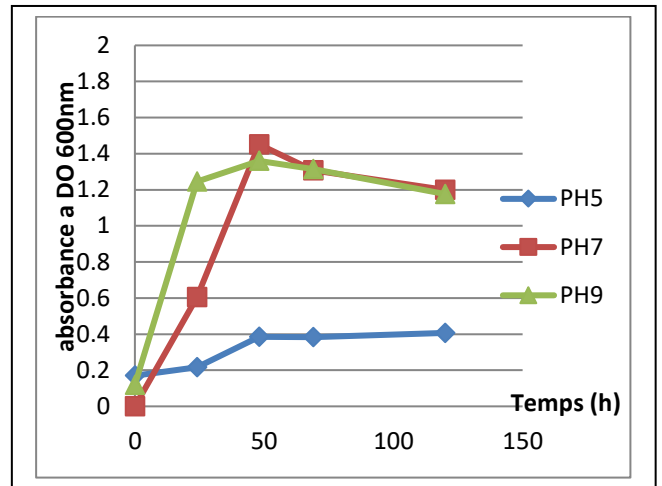


Figure24a : Effet du pH sur la croissance microbienne de *Pseudomona.a*(R17) en présence de 100mg/l de chrome et en utilisant un inoculum de 1%

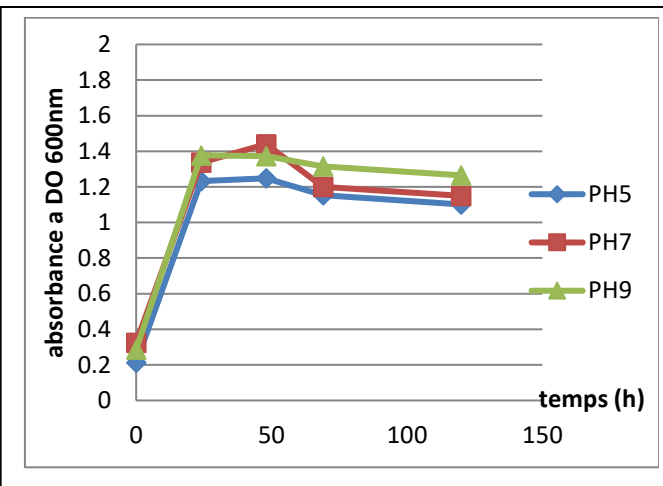


Figure 23b: Effet du pH sur la croissance microbienne de *P. aeruginosa* (R17) en absence de chrome et en utilisant un inoculum de 5%

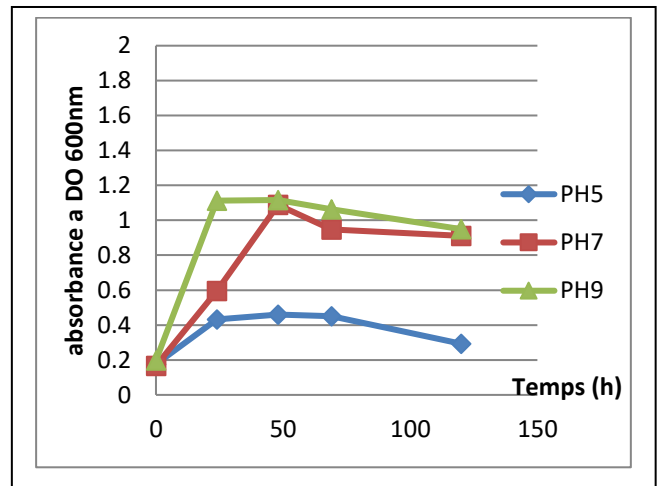


Figure24b : Effet du pH sur la croissance microbienne de *Pseudomona.a*(R17) en présence de 100mg/l de chrome et en utilisant un inoculum de 5%

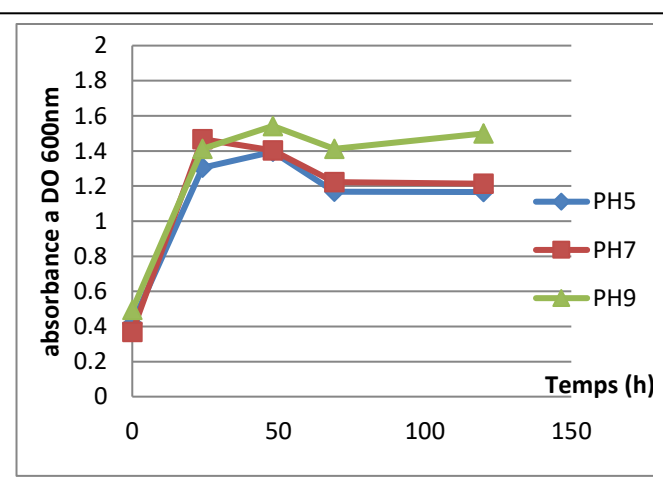


Figure 23c: Effet du pH sur la croissance microbienne de *P. aeruginosa* (R17) en absence de chrome et en utilisant un inoculum de 10%

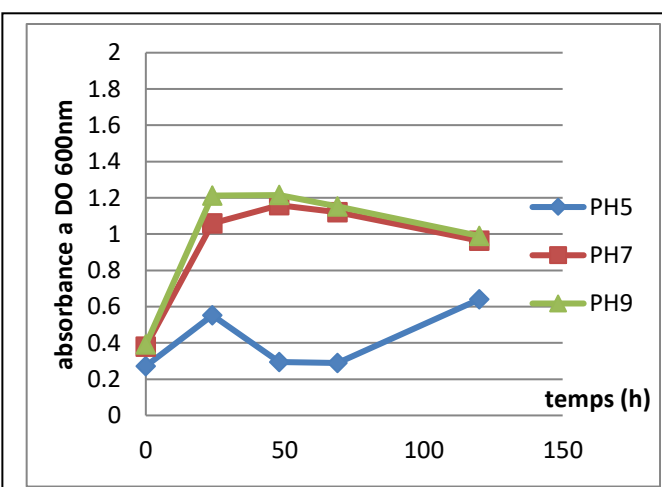


Figure 24c: Effet du pH sur la croissance microbienne de *Pseudomona.a*(R17) en présence de 100mg/l de chrome et en utilisant un inoculum de 10%

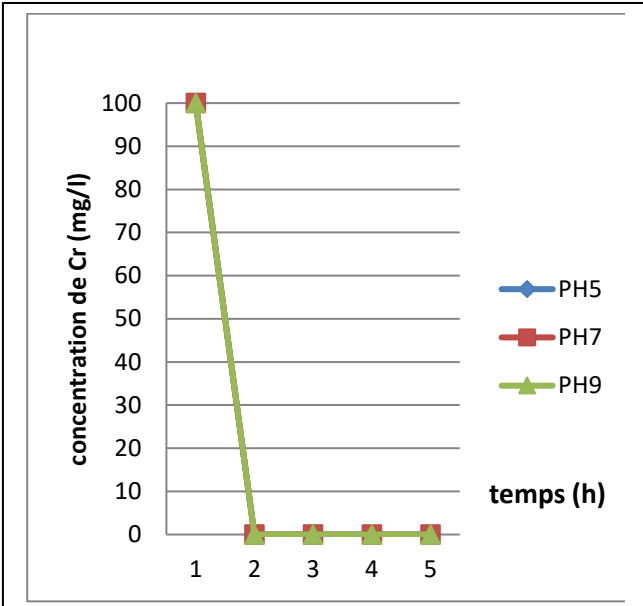


Figure25a: Effet du pH sur l'élimination de 100mg/l de chrome et un inoculum de 1%

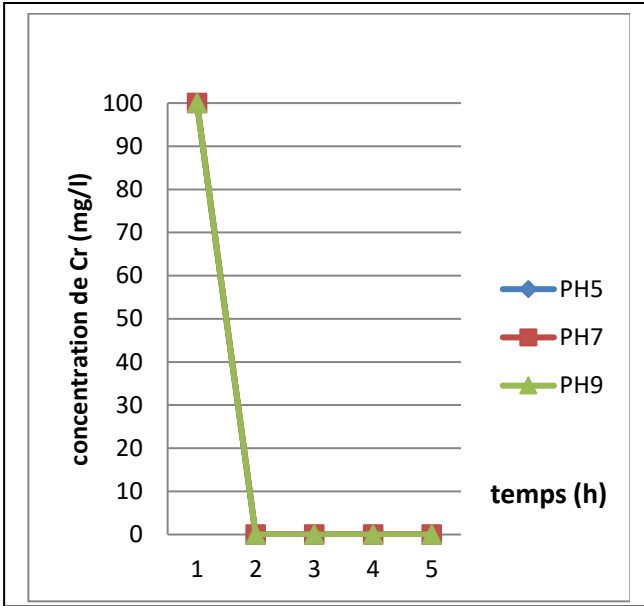


Figure25b: Effet du pH sur l'élimination de 100mg/l de chrome et un inoculum de 5%

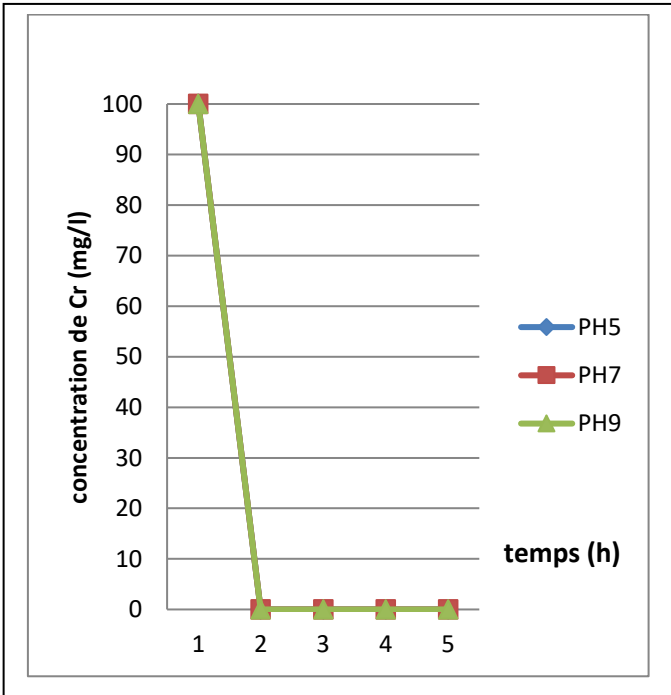


Figure25c: Effet du pH sur l'élimination de 100mg/l de chrome et un inoculum de 10%

III.4.3. Cas de la souche *Staphylococcus aureus* S16

III.4.3.1. Effet de l'inoculum et de la concentration du CrVI sur la croissance microbienne

Le suivi de la croissance microbienne de la souche *Staphylococcus aureus* S16 à une DO de 600nm durant 5 jours (120h) pour différentes concentrations de l'inoculum et différentes concentrations du Cr VI (100 et 200mg/ml) a montré les résultats suivants (figures 26a,b,c et 27a,b,c):

En absence de chrome, la croissance microbienne est pratiquement la même peu importe l'inoculum. Même chose en présence de 100mg/l. Par ailleurs, l'effet inoculum commence à apparaître à la concentration de 200mg/l. Par contre, plus la concentration du chrome augmente, plus la croissance microbienne diminue.

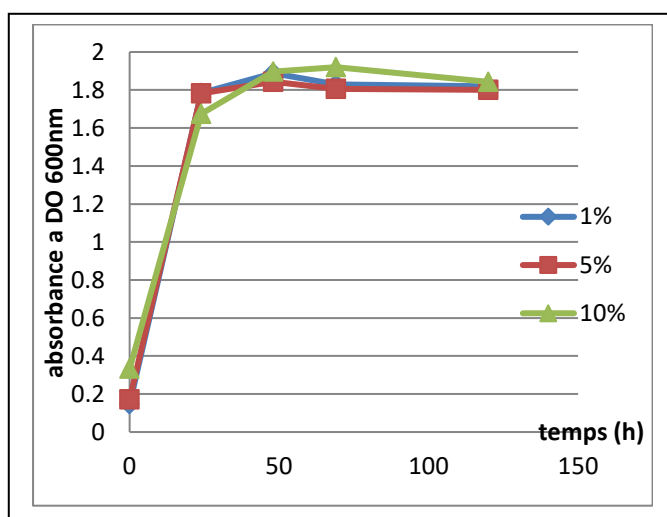


Figure 26a: Suivi de la croissance microbienne de *S. aureus* S16 à Do=600nm pour différentes concentrations d'inoculum en absence du chrome

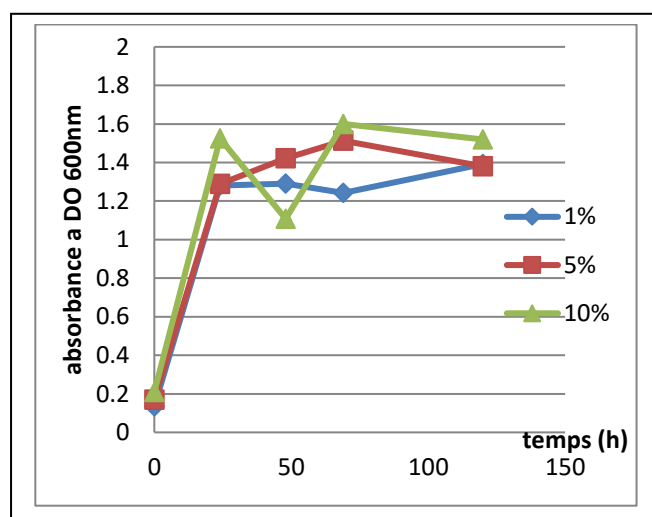


Figure 26b : Suivi de la croissance microbienne de *S. aureus* S16 à Do=600nm pour différentes concentrations d'inoculum et en présence de 100mg/l de chrome

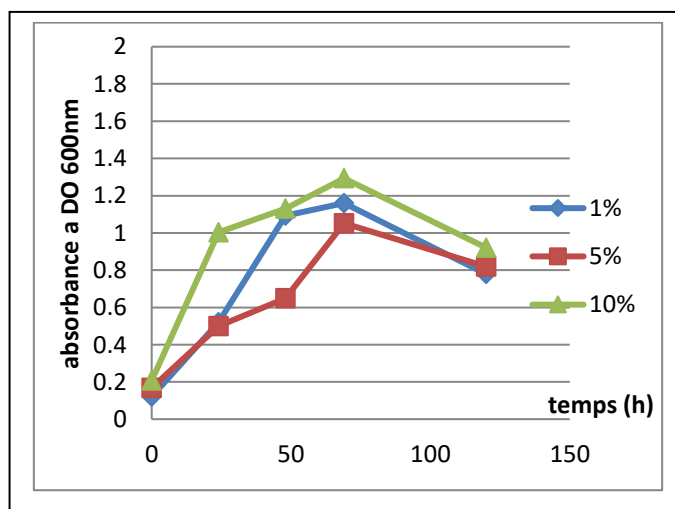


Figure 26c : Suivi de la croissance microbienne de *S. aureus* S16 à Do=600nm pour différentes concentrations d'inoculum et en présence de 200mg/l de chrome

Résultats et Discussion

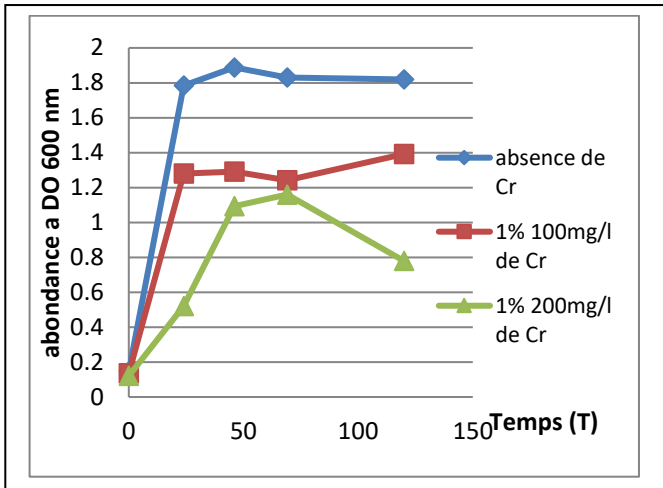


Figure 27a : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de *S. aureus* S16 à $Do=600nm$ pour un inoculum de 1%

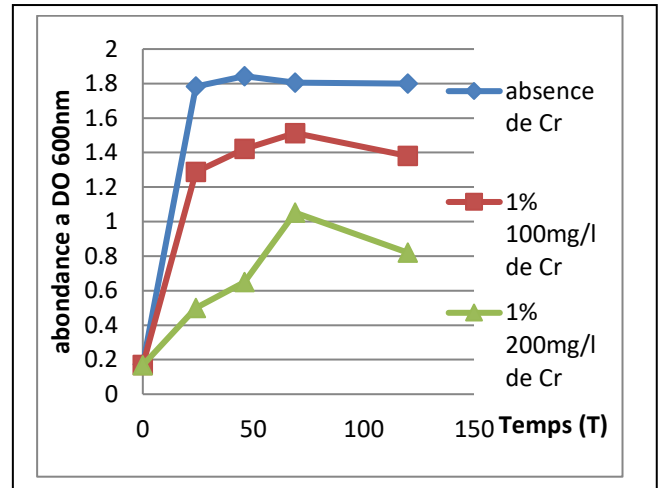


Figure 27b: Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de *S. aureus* S16 à $Do=600nm$ pour un inoculum de 5%

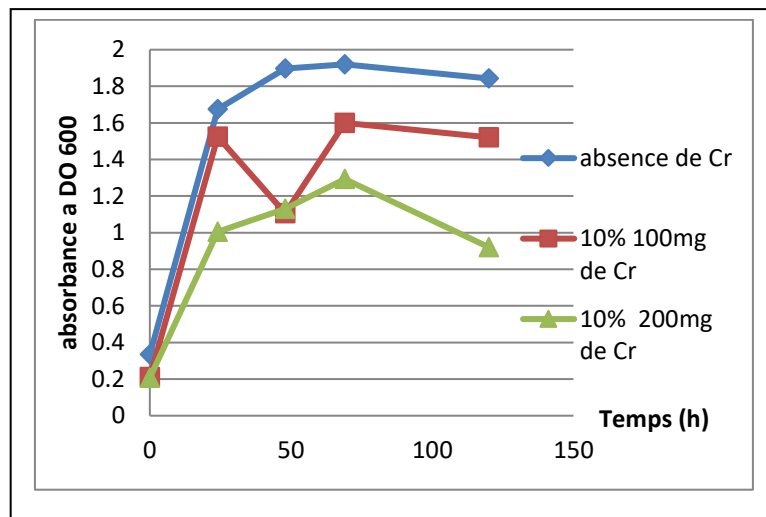


Figure 27c : Effet de la concentration du chrome sur la croissance microbienne de *S. aureus* S16 à $Do=600nm$ pour un inoculum de 10%

III.4.3.2. Effet de l'inoculum et de la concentration initiale du CrVI sur l'élimination du Chrome VI

Les figures 28a et 28b montrent le suivi de l'élimination du chrome dans le milieu lors de l'utilisation de différents inoculum (1%,5%,10%) et une concentration initiale de chrome de 100 et 200mg/ml. Les résultats ont montré que la concentration de 100mg/l est éliminée au bout de 24h. Cependant, pour la concentration de 200mg/l, nous constatons que les taux d'élimination sont sensiblement meilleurs pour 1% puis 5% puis 10% avec des taux respectivement de 96.56%, 91.13% et 86.5%. Un taux de plus de 60% est éliminé au bout de 48h peu importe l'inoculum initiale. Ces résultats corrobore avec ceux de **Zahoor et Rehman (2008)** qui ont trouvé également que *Bacillus sp* et Staphylococcus capables de réduire avec 77% et 65% respectivement, une concentration de 100mg/l. Parallèlement, **Srinath et al (2001)** ont rapporté que l'espèce *Bacillus megaterium* était capable d'accumuler 34.5 mg Cr/g, pour une concentration initiale de 50 mg/l, soit un taux d'élimination de 76%,

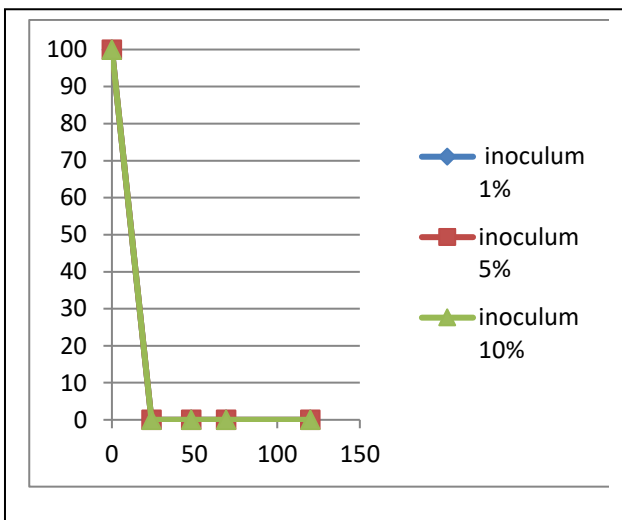


Figure 28a: Suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 100mg/l par *S. aureus* S16 à différentes concentrations de l'inoculum

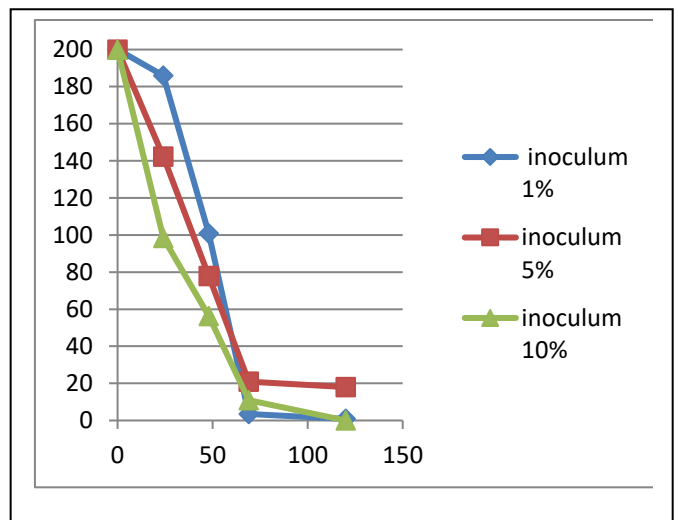


Figure 28b: Suivi de l'élimination du chrome à une concentration initiale de 200mg/l par *S. aureus* S16 à différentes concentrations de l'inoculum

III.4.3.3. Effet du pH sur la croissance et sur l'élimination du chrome

En absence de chrome, *S.aureus* semble avoir une croissance idéale à pH7 suivi de celle de pH9 alors que le pH7 montre une croissance faible mais avec un meilleur résultat pour inoculum 10%.

En présence de chrome, la souche présente une bonne croissance à 7 et 9 alors qu'à pH5, la croissance est presque nulle surtout pour inoculum 1 et 5%.

Résultats et Discussion

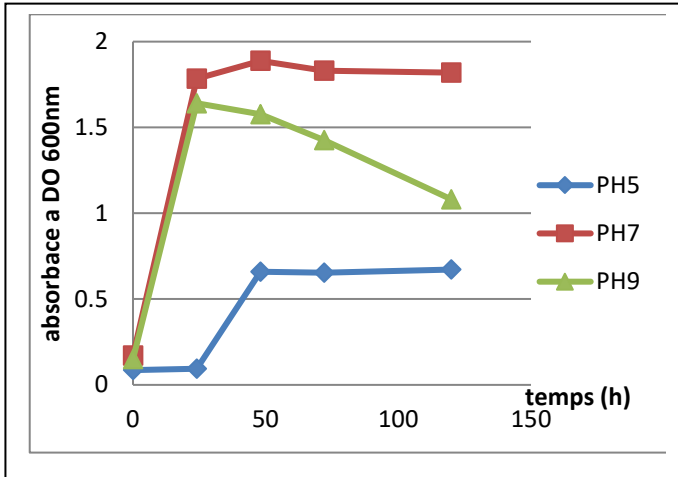


Figure 29a: Effet du pH sur la croissance microbienne de *S. aureus* S16 en absence de chrome et un inoculum de 1%

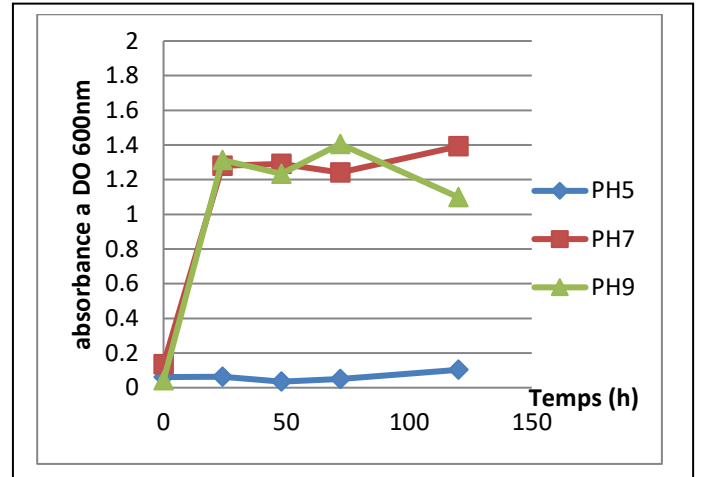


Figure 30a: Effet du pH sur la croissance microbienne de *S. aureus* S16 en présence de 100mg/l de chrome et un inoculum de 1%

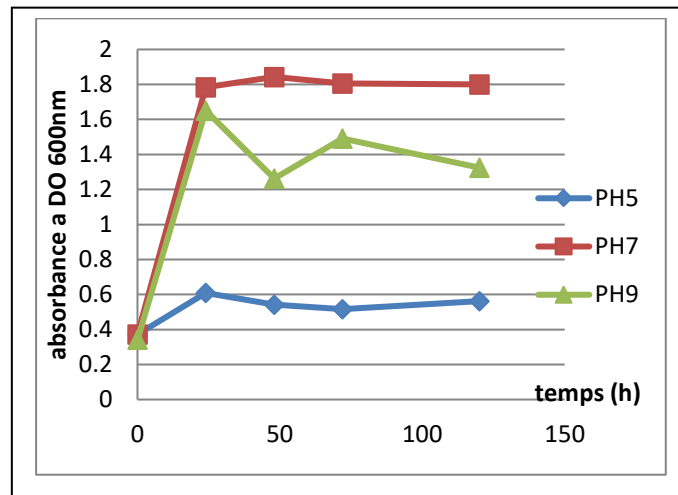


Figure 29b: Effet du pH sur la croissance microbienne de *S. aureus* S16 en absence de chrome et un inoculum de 5%

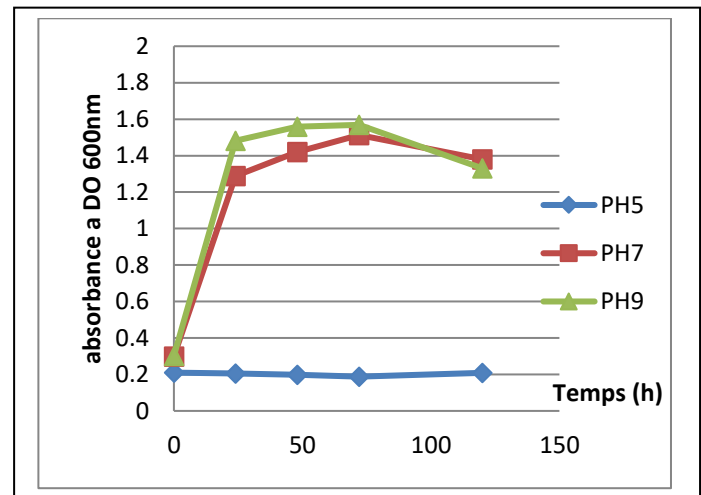


Figure 30b : Effet du pH sur la croissance microbienne de *S. aureus* S16 en présence de 100mg/l de chrome et un inoculum de 5%

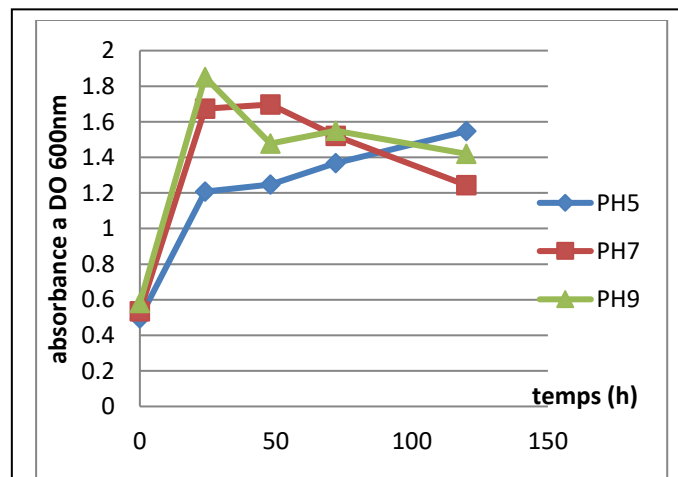


Figure 29c : Effet du pH sur la croissance microbienne de *S. aureus* S16 en absence de chrome et un inoculum de 10%

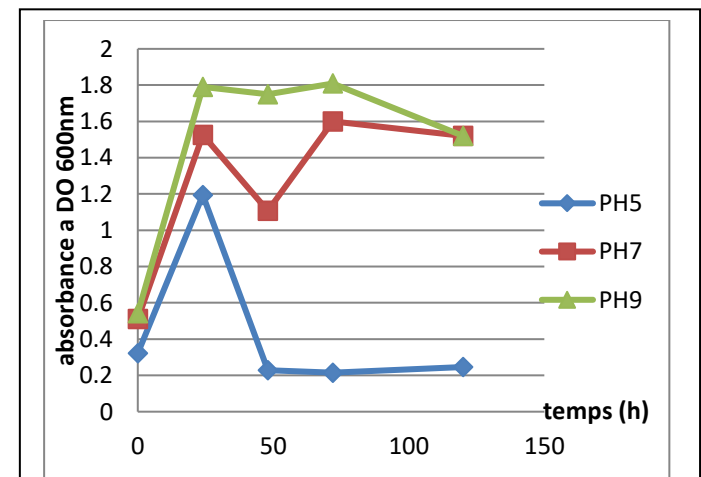


Figure 30c : Effet du pH sur la croissance microbienne de *S. aureus* S16 en présence de 100mg/l de chrome et un inoculum de 10%

Résultats et Discussion

L'élimination du Chrome suit également la croissance microbienne avec une élimination presque totale à pH 7 et 9 en 24h quelque soit l'inoculum initial (figure 31a, b,c). Cependant, pour le pH5, nous constatons que l'élimination du chrome est faible avec des taux de 92.44%, 72.69% et 62.2% pour 1, 5 et 10% d'inoculum respectivement.

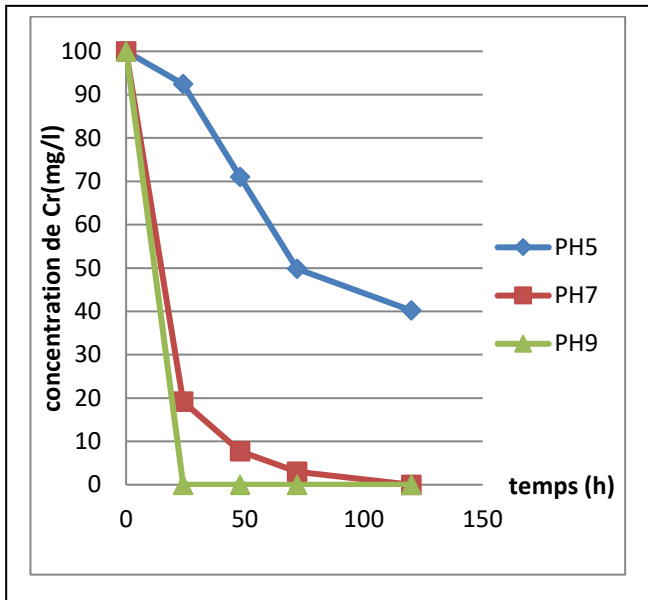


Figure31a: Effet du pH sur l'élimination de 100mg/l de chrome et un inoculum de 1%

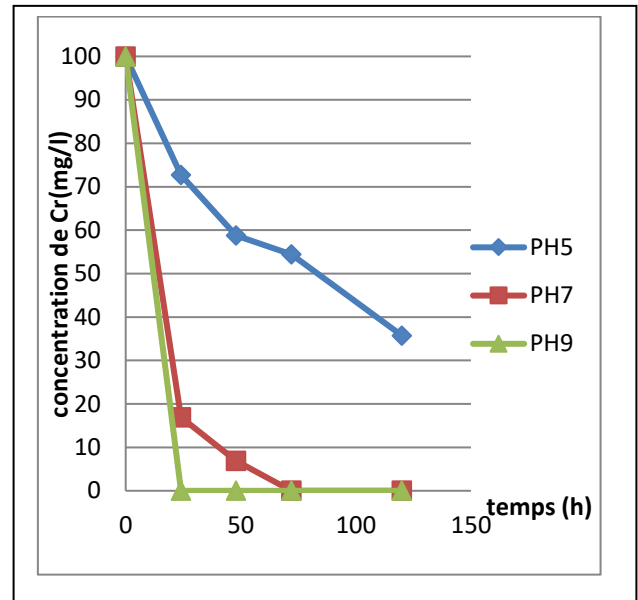


Figure31b: Effet du pH sur l'élimination de 100mg/l de chrome et un inoculum de 5%

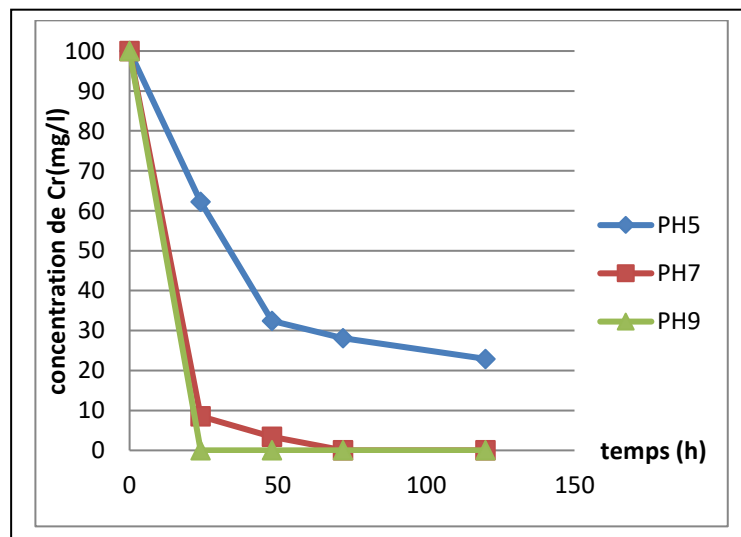


Figure31c: Effet du pH sur l'élimination de 100mg/l de chrome et un inoculum de 10%

Cette partie du travail nous a permis d'étudier les potentialités de trois souches (*Serratia odorifera*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) isolées à partir de biotes marin, à éliminer des concentrations de chrome pouvant être présentes dans des effluents industriels tels que les tanneries ou l'électroménagers. En effet, plusieurs travaux ont montré la présence de ces métaux lourds dans ces différentes industries à des taux entre 40 et 115mg/l (**Genschow et al., 1996**; **Vlyssildes et Israilides, 1997**; **Garrote et al., 1995**). Le traitement de ces effluents permettra la réutilisation de ces eaux usées ou leur élimination vers les réseaux d'assainissement collectifs (STEP) sans risque sur le fonctionnement de ces dernières **Suthanthararajan R et al., (2003)**.

Ces souches ont été retenues pour leur type bactérien à savoir : **Gram négatif** (*Serratia odorifera* et *Pseudomonas aeruginosa*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et leur CMI pour le chrome qui était supérieure à 500µg/ml de Cr, un potentiel largement supérieur à celui demandé pour les effluents industriels (concentration au alentour de 56-159.4mg/l) (**Meric et al., 2005**; **Ram et al., 1999**). Dans une étude de **Rouibah et hafsaoui, (2016)**, la souche *Bacillus megaterium* étudiée tolérait une concentration de 70mg/l de chrome. Alors que **Kathiravan et al., (2011)**, ont rapporté des CMI égales à 50, 40 et 35 mg/L, respectivement pour les souches *Bacillus sp.*, *E. coli* et *Alcaligenes sp.*

La plupart des bactéries réductrices de Cr(VI) signalées sont à Gram négatif (**Francis et al. 2000**). La réduction bactérienne du chrome peut être directe, enzymatique (réduction du Cr(VI) en Cr(III)) ou indirecte par des métabolites bactériens **Wang, et al. 1989**, un efflux de chromate par le transporteur chrA a été retrouvé chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Cupriavidus metallidurans*, constitué d'un processus dépendant de l'énergie et piloté par le potentiel membranaire. Les enzymes les plus caractérisées pour la réduction des chromates appartiennent à la famille des flavoprotéines réductases dépendantes du NADPH. (**Ramirez-Diaz et al., 2008**).

Les souches étudiées ont été capables d'éliminer la totalité du chrome à une concentration de 100mg/l dans les 24h. Par ailleurs, l'élimination du chrome pour une concentration initiale de 200mg/l a nécessité un temps plus important (120h) avec des taux finaux supérieurs à 90% à l'exception de la souche *S.aureus* avec un inoculum de 10% où le taux était de 86.5%. L'élimination d'un taux d'environ 50% nécessite 48h pour l'ensemble des souches et peu importe l'inoculum utilisé à l'exception de la souche *P.aeruginosa* avec un inoculum de 10%, où un taux de 50% d'élimination a été observé en 24H.

L'étude de l'effet de l'inoculum sur le taux de l'élimination du chrome, a montré une accélération dans l'élimination du chrome dans les premières 24h pour les souches *S.odorifera* et *P. aeruginosa* avec un inoculum de 10%. Ceci peut s'expliquer par le démarrage rapide de la croissance et l'atteinte d'une phase exponentielle. Plusieurs travaux ont rapporté l'importance de la quantité initiale de l'inoculum sur l'élimination du chrome.

Emadzadeh et al., (2016), ont rapporté qu'un taux d'élimination du chrome (50mg/l) par la souche *Bacillus cereus* a été observé en 24h pour le volume le plus élevé utilisé (20ml).

De plus, Plusieurs auteurs ont rapporté que la réduction du Chrome augmente avec l'accroissement de la concentration de l'inoculum (Xiao et al., 2017 ; Pal et Paul, 2004). Dans le même sens, Sethuraman et Balasubramanian, (2010), ont étudié l'effet de la concentration de la biomasse sur la biosorption des ions métalliques dans un système discontinu par *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *E. cloaca*. Cette étude a révélé que l'efficacité de l'élimination des ions du Cr (VI) augmentait avec l'augmentation de la concentration de la biomasse. Ce constat peut être expliqué par l'augmentation du nombre des sites de liaison du chrome sur la surface, ce qui augmenterait la biosorption des ions Cr (VI) (Kathiravan et al., 2011) d'une part et la réduction de la phase de latence d'une autre part (Srinath et al., 2001).

Le suivi de la croissance microbienne en présence et en absence de chrome, a montré que le chrome réduit la croissance bactérienne comparativement au témoin. Toute fois nos souches résistaient à des concentrations allant jusqu'à 200mg/l. Ces résultats corroborent ceux rapporté par Soha et Sahar (2010) où la croissance des souches de *Bacillus* étudiées était affectée en présence de 40mg/l tout en tolérant 100mg/l. D'autres auteurs ont également rapporté effet du chrome sur la croissance microbienne (Athanasios et al., 2001 ; Garbisu et al., 1998).

Nos résultats sont aussi en accord avec les travaux de Srinath et al., (2001), les auteurs ont trouvé que sur 71 souches microbiennes isolées des effluents de la tannerie, seulement 11 d'entre elles étaient en mesure de tolérer des concentrations supérieures à 100 mg/L de Cr (VI),

A partir des résultats montrés dans les figures(25 b,31 b, 37 b), on constate que la diminution du Cr pour la concentration de 200mg/l, pour les trois souches, était très faible durant les premières 24h d'incubation , ce qui pourrait correspondre à une période de latence, durant laquelle les souches microbiennes préparent leur matériel enzymatique, pour dégrader le chrome. A partir de t48h, les souches entrent dans une phase d'élimination plus importante du chrome, bien visible dans la figure(23c ,29c et 35c) relative au taux d'élimination. L'allure de ces courbes est similaire à celle obtenue par Katragadda et al., (2013) lors de l'étude de l'élimination du chrome (50 mg/l), par les souches *Ochrobactrum anthropi* et *Chromobacterium violaceum* où une augmentation exponentielle du pourcentage de réduction du chrome après 48 h d'incubation à 37 C a été observée. Srinath et al., (2001) ont rapporté que la phase de latence devient encore plus prolongée à partir d'une concentration de 100 mg/ l de Cr (VI) pour les *Bacillus megaterium* et *Bacillus circulans*.

Plusieurs études ont également rapporté l'efficacité des souches appliquées sur des effluents contaminés (Ohtake et Hardoyo, 1991; Ganguli et Tripathi, 2002) et que les taux de réduction sont semblables à ceux obtenus lors de l'application de souches dans un milieu nutritif(Zahoor et Rehman, 2008; Amrik et Anshu, 2013).Donc nos souches semblent avoir un grand potentiel pour l'élimination du chrome.

Les recherches ont révélé que la réduction du Cr(VI) dépend du pH, de la température, de la concentration de l'inoculum et de la concentration de Cr(VI) (Camargo et

al., 2003). Généralement, la plupart des bactéries résistantes au Cr(VI) peuvent effectuer une réduction du Cr(VI) dans une plage de température optimale de 30 °C à 37 °C (**Losi, Amrhein et Frankenberger, 1994**).

L'étude de l'influence du pH sur la croissance bactérienne et l'élimination du chrome a été réalisée en présence de 100mg/l à 37°C et à pH5, 7 et 9. Les résultats ont révélé que la souche *Serratia* a une bonne croissance et un bon taux d'élimination à pH 9 et 7. Alors qu'à pH 5, la croissance est plus faible et le taux d'élimination diminue avec l'augmentation de l'inoculum. Concernant *Pseudomonas*, nous avons constaté, un bon taux de croissance et d'élimination de chrome à pH 9 et 7. Alors qu'un taux de croissance très faible par rapport au témoin a été observé à pH5, tous en gardant un taux d'élimination de chrome à 100%. Pour *Staphylococcus*, la souche présente une meilleure croissance et taux d'élimination de chrome à pH7 puis 9. Cependant, elle ne tolère pas le pH5.

Dans ce contexte, **Paknikar et al., (1999)** ont rapporté que le pH, est un facteur qui a une influence importante sur le phénomène de biosorption, certaines souches sont plus actives dans un milieu basique, alors que d'autres sont plus actives dans un milieu acide. De même **Shakoori et al., (2000)**, ont rapporté que le pH optimal de réduction du Cr (VI) pour les bactéries à gram positif était égal à 9, tandis que **Liu et al., (2004)**, ont constaté que le pH optimal pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus coagulans* était égale à 7.. Un pH alcalin et 30 °C constituent le bioparamètre optimal pour la croissance de bactéries résistantes ou réductrices du Cr(VI) telles que *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringensis* et *Arthrobacter crystallopoites* (**Farrell et Ranallo, 2000**).

Sethurman et Balasubramanian, (2010), ont démontré que les souches *E. cloacae* et *P. aeruginosa* ont la capacité d'adsorber le chrome dans une gamme de pH de 2 à 9 avec une réduction maximal dans les pH alcalins, due à l'activité des ions hydrogène, car à faibles valeurs de pH, les groupes fonctionnels transfèrent les ions H⁺ ce qui indique que la majorité des sites de liaison étaient occupés. Lorsque le pH augmente, la concentration des ions H⁺ diminue et la surface de la biomasse chargée négativement peut interagir avec les ions métalliques chargés positivement.

D'autres études ont montré que *B. cereus* et *S.odorifera* ont la capacité de réduire le Cr (VI) dans un milieu à une concentration de 1000 µg/ml en Cr, avec un maximum à pH 9, où plus de 70% de l'activité de réduction au pH optimal (pH=8) est perdue lorsque le pH est changé à 5 **Singh et al., (2013)**. Tandis que, **Aslam et al., (2016)**, suggèrent que le changement progressif du pH neutre au basique d'un lixiviat favorise la réduction du Cr par *Bacillus megaterium*-ASNF3. Ces résultats indiquent que la variation des valeurs du pH initial induit une variation de la capacité d'élimination du Cr (VI) quel que soit le mécanisme impliqué, ce qui confirme que le pH est un facteur important pour la performance des procédés à grande échelle.

Les trois souches sélectionnées ont un très grand potentiel pour être utilisée dans le traitement des eaux contaminées par le chrome

L'objectif de cette étude était l'évaluation et la caractérisation de la résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques des bactéries isolées à partir de poissons marins ayant des habitats différents: *Sardina pilchardus* (la sardine commune) et *Mullus barbatus* (le rouget de vase) ainsi que l'isolement et l'application de certaines souches résistantes dans l'élimination du chrome. Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que :

- La résistance aux métaux lourds chez la **flore totale** était globalement faible à moyenne pour le plomb, le cuivre et le zinc et faible pour le cadmium et le mercure alors qu'une sensibilité totale a été observée pour le chrome.
- La résistance aux métaux lourds chez les **coliformes totaux** était globalement faible à moyenne à l'exception du troisième échantillon du rouget qui a montré la présence d'un taux important de coliformes résistants au Hg, Cu, Zn et Cr.
- L'analyse statistique des résultats des taux de résistance aux métaux lourds obtenus chez la Sardine et le Rouget a montré une différence statistiquement non significative entre les deux poissons. Bien que, le rouget est connu pour accumuler davantage les métaux toxiques. Ces résultats corroborent les résultats de **Touahir(2017)** concernant la résistance aux antibiotiques selon l'habitat du poisson.
- La plupart des souches étaient multirésistantes aux métaux lourds et présentent une résistance associée aux antibiotiques.

Cette étude a permis d'évaluer l'état de la résistance aux métaux lourds dans les différents sites afin de comprendre la dissémination de la résistance dans l'environnement d'une part, et a également permis d'isoler des souches multirésistantes aux métaux dans un intérêt biotechnologique à savoir le traitement des rejets industriels et la bioremédiation d'autre part.

Trois souches (*Serratia odorifera*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) ont été testées pour leur potentiel à éliminer le chrome VI dans différentes conditions opératoires à savoir la concentration initiale du chrome, l'inoculum et le pH en suivant la croissance bactérienne et la concentration du chrome. Les résultats ont montré :

- L'augmentation de l'inoculum favorise la cinétique microbienne et l'élimination du chrome surtout dans les premières 24h, ceci serait dû à la réduction de la phase de latence et à la disponibilité des sites d'adsorption du chrome.
- La concentration initiale du chrome a un effet négatif sur la cinétique microbienne. Bien que nos souches ont toléré les 200mg/l.

Conclusion

- Le pH influe sur la croissance microbienne et sur le phénomène d'élimination du chrome. En fonction des souches cette élimination peut être intéressante à pH basique ou acide. Concernant nos souches les résultats étaient comme suit :
- La souche *Serratiaodorifera* : a une bonne croissance et un bon taux d'élimination du chrome à pH 9 et 7. Alors qu'à pH 5 la croissance est plus faible et l'élimination du chrome est plus faible en présence d'et l'élimination du chrome est plus faible en présence d'un inoculum 10%
- La souche *Pseudomonas aeruginosa* : un bon taux de croissance et d'élimination de chrome à pH 9 et 7. Alors qu'un taux de croissance très faible par rapport au témoin a été observé à pH5. Cependant, l'élimination du chrome 100mg/l était totale en 24h peu importe le pH.
- La souche *Staphylococcus aureus*, une meilleure croissance et taux d'élimination de chrome à pH 7 puis 9. Cependant, la souche ne tolère pas le pH5 et l'élimination du chrome est faible à ce pH

Compte tenu de l'ensemble des résultats fournis par cette étude, les 3 souches pourraient être considérées comme des matériaux biologiques assez prometteur pour être utilisées dans un procédés biologiques d'élimination du chrome (VI) présent dans les effluents liquides de plusieurs industries à savoir les tanneries, l'électro-ménagers.. Ce procédé est peu coûteux, du fait de la disponibilité de la souche sur site et de son renouvellement perpétuel, comparé aux coûts relativement élevés des techniques de dépollution physico-chimiques.

Cependant, afin de fiabiliser nos résultats, il serait judicieux de compléter ce travail par une étude plus approfondie des différents paramètres pouvant influencer sur la réduction du chrome (VI) dans les effluents industriels, et de proposer un procédé de traitement en continu.

Dans la perspective qu'un jour nous puissions mettre en œuvre ces résultats et les exploiter dans le traitement biologique des effluents industriels, le suivi et la compréhension des mécanismes qui régissent le processus de résistances aux métaux lourds dans le milieu aquatique, est d'une immense importance. Il est également nécessaire de caractériser génétiquement les mécanismes impliqués dans cette résistance aux métaux lourds et en particulier la réduction du chrome hexavalent. Il est également, important de maîtriser l'engineering afin de proposer un procédé biologique en continu pour le traitement des effluents chargés en chrome.

Références bibliographiques

A

- Arana , (1997)** Arana I., J. I. Justo, A. Muela, M. Pocino, J. Iriberry, and I. Barcina. 1997. Influence of a Survival Process in a Freshwater System upon Plasmid Transfer Between E. coli. Microb 12 P
- APHA (2005)** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC 36 P
- Aendekerket , (2002)** Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. Microbiol., 21 P
- Amoozegar M A, Ghasemi A, Razavi M R etNaddaf S. (2007)**. Evaluation of hexavalentchromium reduction by chromate-resistant moderately halophile *Nesterenkonia* sp MF2. ProcessBiochemistry. 25 P.
- **Alouache , (2011)**Antibiotic resistance and extended-spectrum β -lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). Microbes Environ. 39 P
- Alam , (2020)** ; Software defined infrastructure for operational numerical weather prediction, communications in computer and information science. In Driving scientific and engineering discoveries through the convergence of HPC, big data and AI - 17th smoky mountains computational sciences and engineering conference, Oak Ridge, TN, USA, 2020. 44P
- **Al-Jebouri, (1985)**; A note on antibiotic resistance in the bacterial flora of raw sewageand sewage-polluted River Tigris in Mosul, Iraq. J. Appl.Bacteriol., P.P. 58, 47.
- Athanasios ,(2001)** Effect of chromium(VI) on bacterial kinetics of heterotrophic biomass of activated sludge ;Water Research 66 P.
- **Amrik et Anshu, (2013)**. Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich. Industrial wastewater P.P. 35-66.
- Aslam , (2016)** Dual action of chromium-reducing and nitrogenfixing *Bacillus megaterium*. 3 Biotech, 67 P

B

- Barcina , (1997)** Barcina I. Arana I. Santorum P. Iriberry J. Egea L. (1997) Direct viable count of Gram-positive and Gram-negative bacteria using ciprofloxacin as inhibitor of cellular division. J. Microbiol. Methods22 P 12
- (Barrera-Diaz ,(2012)**.A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction P 25
- Bauvais, (2015)** Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. Mar. Environ. 39 P

Références bibliographiques

- Burnol, (2006)** Rapport d'étude : Eléments traces métalliques : Guide méthodologique : Recommandations pour la modélisation des transferts d'éléments trace métalliques, dans les sols et les eaux souterraines. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. 17 p.
- Bruins , (2000)** Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 19 P.
- Blindauer., (2001)** Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.*, 19 P.
- Blériot , (2014)**; Cu binding by the Escherichia coli metal-efflux accessory protein RcnB. *Metallomics.vol 6* ,20 P..
- Baker Austin ,(2006)** Co-selection of Antibiotic and Metal Resistance. *Trend. Microbiol.*,P.P 20-21.
- Benguendouz A, (2018)**. Caractérisation nutritionnelle, toxicologique et aptitude technologiques de « Sardine pilchardus » pêchée dans la côte Algérienne. Thèse de doctorat en sciences. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.P.P 5-7
- Bradl H. (2005)**. Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation. Elsevier 23 P
- Benhalima , (2020)** ; «Gynaecological cancers and career path for women in working age: evidence from administrative data in France», Barnay T., 44 P
- C
- Campos, (2005)** Chromate reduction by *Serratia marcescens* isolated from tannery effluent. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 24 P
- Chiffolleau., (2004)** La contamination métallique. Ifremer Edition .16 p.
- Comte ., (2008)**; Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. *J. Hazard. Mater.*, 19 p.
- Croteau,(2005)** Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.*, 50: P.P 11–19.
- Chlaida M, (2009)**. Variabilité allozymique associée au flux migratoire des populations des sardines, *sardina pilchardus*, le long de la côte nord ouest africaine. Thèse de doctorat en biologie. Université Mohammed V- AGDAL Faculté des sciences Rebat.P.P 28-29
- Chitour .(2018)** Etude de l'antibiorésistance et de la tolérance aux métaux lourds des entérobactéries et des staphylocoques. Mémoire de master .Microbiologie appliquée. Université 8 mai 1945 GUELMA.P.P 66-47
- Caille.(2007)**. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 47 P.
- Chellaiah (2018)**, Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview 47 P

Références bibliographiques

-**Camargo , (2003)**. In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29 stimulated by Cu²⁺. *Applied Microbiology and Biotechnology* .66 P.

D

-**De Philippis, (2011)** Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from ter: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*vol 92 . 19 p.

-**DeForest., (2007)** Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicol.* ,P12.

-**Dhakephalkar P, Bhide V et Paknikar K. (1996)**. Plasmid mediated chromate resistance and reduction in *Pseudomonas mendocina* MCM B-180. *Biotechnology Letters*. 25 P

-**Djabali, (1993)** Empirical equations for the estimation of natural mortality in Mediterranean. *Teleosts. NAGA, the ICLARM quart:* 29 P

-**Dieuzeid R., (1959)** Catalogue des poissons des côtes algériennes. Tome II : Ostéopterygiens (2^{ème} édition) 29 p

-**Delarras., (2010)**. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux(2^o Éd.) ,Réglementation, micro-organismes, prélèvements, analyses P.P 29-30

-**Delarras, (2007)**. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éd. Médical I., Lavoisier 32 P

-**(Delarras, (2003)**. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éd. Médical I., Lavoisier 34 P

-**Duxbury (1981)** Toxicity of heavy metals to soil bacteria. *FEMS Microbiol. Lett* .P 43

-**Diaz-Ravina , (1994)**. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique 47 P.

-**Desaunay (2012)** Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun. *Sciences de la Terre*. Université de Grenoble.

E

-**Endo , (2002)**, Le développement socioculturel à travers les générations Nobuo Endo Museum international, ISSN 0304-3002, N^o. 213-214, 2002 (Ejemplar dedicado a: Angkor, un musée vivant) P .12

-**Emadzadeh ., (2016)**, Experimental study on the factors affecting hexavalent chromium bioreduction by *Bacillus cereus*. *Int J Eng Trans B*, 65 P

F

Références bibliographiques

-**Faisal, (2005)** Chromium-resistant bacteria and cyanobacteria: impact on Cr (VI) reduction potential and plant growth. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 25 P.

-**Figarella, J. (1998)** L'étude cyto bactériologique des produits pathologiques constitue, avec les recherches sérologiques, l'apport le plus significatif du laboratoire au diagnostic des infections. Est proposée une approche par type de prélèvement, 32 P

-**Fariaet (2009)** Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Science of the total environment*. 47 P.

-**Francis, Obratsova et Tebo, (2000)**. Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 P

-**Farrell et Ranallo, (2000)**. Experiments in biochemistry. A hands-on approach. Orlando, FL: Saunders College Publication. 67 P

G

-**Garrote, (1995)** Treatment of tannery effluents by a two step coagulation flocculation process. *Water Res.*, P.P 29, 65

- **Ghosh, (2010)** Wetland macrophytes as toxic metal accumulators. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 16 P

- **Gehong, (2009)** Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials*. 17 P

-**Gadd (1992)** Metals and microorganisms: A problem definition. *FEMS Microb. Letter*, 17 P.

- **Gadd et Smith, (2000)** Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 18 P.

-**Guiraud, (2003)**. Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemos.*, P.P 52 32.

-**Gheju M, Balen 1, Vancea C. (2016)**.An investigation of Cr (VI) removal with metallic iron in the presence of sand and/or MnO₂. *Journal of Environmental Management*. 170: P.P 145-151.

-**GENSCHOW , (1996)** Biological sulfate removal from tannery wastewater in a two-stage anaerobic treatment. *Water Res.*, P.P 30, 65.

-**Garbisu ,(1998)** Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation*. 66 P.

-**Ganguli et Tripathi, (2002)** Survival and chromate reducing ability of *Pseudomonas aeruginosa* in industrial effluents. *Applied Microbiology*. 66 P.

H

-**Hazrat ., (2013)** Phytoremediation of heavy metals Concepts and applications. *Chemosphere*. P 15

- **Huynh, (2009)** Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/ microflore tellurique. Thèse de doctorat. Université Paris est, France, 17 P

Références bibliographiques

- **Hobman, (2007)** Transcriptomic Responses of Bacterial Cells to Sublethal Metal Ion Stress. In: Molecular Microbiology of Heavy Metals. D.H. Nies, S. Silver: Editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.18 P.

-**Harrah., (2006)** Microbial Exopolysaccharides. In, Dr,M.D.P., Falkow,S., Rosenberg,E., Schleifer,K.-H., and Stackebrandt,E. (eds), *The Prokaryotes*. Springer New York. ,19 P..

-**Hobman et Brown, (1997)** Bacterial mercury-resistance genes. *Met Ions Biol. Syst.*, P.P 34-20

-**Husnain A, Qazi 1 A, Khaliq W etArshad M. (2016)**. Immobilization in cement mortar of chromium removed from water using titania nanoparticles. *Journal of Environmental Management*. 24 P

-**Hassen (1998)** a *Drosophila* phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, is required for cell viability, germline development and bristle morphology, but not for neurotransmitter release. *Genetics* 43 P

-**Harakeh . (2006)** Microbial Exopolysaccharides. In, Dr,M.D.P., Falkow,S., Rosenberg,E., Schleifer,K.-H., and Stackebrandt,E. (eds), *The Prokaryotes*. New York :Springer ., 47 P.

I

-**Ishibashi, (1990)** Chromium Reduction in *Pseudomonas putida*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 24 P

-**Ivanova , (2002)** Tolerance to Cadmium of Free-Living and Associated with Marine Animals and Eelgrass Marine Gamma-Proteobacteria. *Curr. Microbiol*. 19 P

J

-**Ji and Silver, (1995)** Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.Vol* 14 .19 p.

-**Jones, Jones, D. F. ; Weiss, W. P. ; Jenkins, T. C., (1998)**. Dietary fish oil for dairy cows: 2. Effects on neutrophil function and digestibility. *Special Circular - Ohio Agricultural Research and Development Center*, P.P 163- 22.

-**Joffin et Leyral (2006)** Microbiologie technique. Tom 1. Dictionnaire des techniques.Bordeaux, France: Centre Régional De Documentation Pédagogique, 23P

K

- **Kabata et Pendias,(2001)**. Trace elements in soils and plants. 3èmedition. CRC Press, Boca Raton. London.16 P.

- **Kaimoussi ., (2005)** Seasonal Variations of Metal Concentrations (Cd, Cu, Fe, Mn and Zn) in Algae *Fucus spiralis* from the Coast of El Jadida City (Morocco). *Water Quality Research Journal of Canada*. P 16

-**Kushwaha S, Sreedhar B etSudhakar PP. (2012)**. A spectroscopic study for understanding the speciation of Cr on palm shell based adsorbents and their application for the remediation of chromeplating effluents. *Bioresource Technology*. 24 P

-**Kaluzhnaya et Itskovich, (2014)** Phylogenetic diversity of microorganisms associated with the deep-water sponge *Baikalospongia intermedia*. *Russ. J. Genet.vol* 46 P.

Références bibliographiques

-**Kathiravan , (2011)** Ex situ bioremediation of Cr (VI) contaminated soil by Bacillus sp.: batch and continuous studies. Chemical engineering journal,P.P. 65-66.

-**Katragadda (2013)** Detoxification And Bioremediation Of Chromium (VI) From The Tannery Effluents. International Journal of ChemTech Research. 66 P.

L

-**Lovley et Coates, (1997)**. Microbes with a metal for bioremediation. Nat. Biotechnol., P.P 18-22.

-**Li et Xue,(1001)** Docteur en Etudes chinoises Université d'Artois 24 P

-**Loué, (1993)**-éléments en agriculture. 2ème édition. Editions Nathan. Paris. 16 p.

- **Lozniewski et Rabaud, (2010)** Résistance bactérienne aux antibiotiques, infections associées aux soins, CCLIN 18 P.

- **Livermore,(2003)**. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin. Infect. 18 P.

Liebert , (1999) Transposon Tn21, flagship of the floating genome. Microbiol. Mol. Biol. 45 P

-**Losi ME, AmrheinCetFrankenberger J. (1994)**. Environmental biochemistry of chromium. 23 P

-**(Leclerc,, (1999)**Department de Chimie, Université de Montréal montréal, PQ, H3C3J7(CanadaMario Leclerc was awarded a Ph.D. in chemistry from Laval University, Quebec City, Canada 50 P

-**Losi,Amrhein et Frankenberger, (1994)**. Chromium-resistant microorganisms isolated from evaporation ponds of a metal processing plant. Water Air and Soil Pollution. 67 P.

-**Liu (2004)** Experimental study on reduction by Pseudomonas aeruginosa. Journal of Environmental Sciences 67 P.

M

-**Monachese , (2012)**.Monachese, M., Burton, J., & Reid, G. (2012).Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: A potential role for probiotics? Applied and Environmental Microbiology, 24 P

-**Memon et Schröder, (2009)** Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. Environmental Science and Pollution Research. 17 P.

-**Martinez., (2009)** A global view of antibiotic resistance. FEMS. Microbiol. P.P 12-20

-**Mahi M, (2010)**. Etude technologique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de brebis. Thèse de magister. Université d'Oran

-**Meric (2005)**Toxicity of leather tanning wastewater effluents in sea urchin early development and in marine microalgae. *Chemosphere*, 65 P

N

- **Nithya (2011)** Assessment and characterization of heavy metal resistance bacteria in Palk Bay sediment. Mar. Environ. Res., 16 P.

Références bibliographiques

- **Naithani et Kakkar,(2005)** Evaluation of heavy metals in Indian herbal teas. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 17 P.

- **Nies, (2003)** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev., 27: 18 P

Nezengue, (2008) Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc: place des métallothionéines. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier Grenoble. 19 p.

Nies et Silver, (1995) Ion efflux system involved in bacterial metal resistance and Microbial., 20 P

-**Namadi (2016)**, ,The use of Antibiotics for the Management of Severe Acute Malnutrition: A Review. (July 2016). Sokoto Journal of Medical Laboratory Science. 1(1):82-89. (Maiden edition). ISSN 2536-7153

O

-**Ohtake et Hardoyo, (1991)**; Effects of heavy metal cations on chromate reduction by *Enterobacter cloacae* strain HO1. Journal of General Applied Microbiology. 66 P.

P

-**Pollman ., (2006)**. Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. Biotech. Adv., P.P 24 22.

-**Pillai et Archana, (2012)**. A novel process for biodegradation and effective utilization of chrome shavings, a solid waste generated in tanneries, using chromium resistant *Bacillus subtilis* ,rocess Biochemistry 23 P

-**Pamukcu,(1992)**, Electrokinetic removal of selected heavy metals from soil. Environmental Progress.24 P

-**Pang, (2011)**Arachidonic acid-derived epoxyeicosatrienoic acids (EETs) are important regulators of cardiac remodeling; manipulation of their levels is a potentially useful pharmacological strategy. EETs are hydrolyzed by soluble epoxide hydrolase (sEH) to form the corresponding diols, thus altering and reducing the activity of these oxylipins. To better underst 36 P

-**Paknikar ., (1999)**. Development of microbial biosorbents-a need for the standardization of experimental 67 P

-**Pagès , (2007)** Exploration of intracolonial adaptation mechanisms of *Pseudomonas brassicacearum* facing cadmium toxicity. Environement Microbioly. 18 P..

-**Perron., (2004)** CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem., P.P 45-47

-**Pennanen , (1996)** Phospholipid fatty acid Composition and Heavy Metal Tolerance of Soil Microbial Communities Along Two HeavyMetal-Polluted Gradients in Coniferous Forests. Appl. Environ.Microb. 43 P.

-**Pal et Paul, (2004)** Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. Microbiological Research, 66 P.

Références bibliographiques

Q

-Québec, (2006) CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en chimie, DR-12-SCA-01, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante 36 P

R

-Renninger , (2004). Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol* 22P

-Robert et Juste, (1999) des éléments traces de l'écosystème sol. In Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: CRIN.

-Robert et Juste, (1999) Enjeux environnementaux et industriels -• Dynamique des éléments traces dans l'écosystème sol. In: Spéciation des métaux dans le sol. Les Cahiers du Club Crin, Paris, P 15

-Rouch , (1995) Copper-inducible transcriptional regulation at twopromoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant *pco*. *Microbiol.*, 1 9P.

-Rouibah et hafsoui,2016 Evaluation de l'effet de quelques paramètres sur l'élimination du chrome hexavalent par *Bacillus megaterium*.thèse de masterde l'université de Jijel. 65P

-Ramirez-Diaz (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals* . 65 P

-Ram (1999) Kinetics of chrome-tannery effluent treatment by the activated-sludge system. *Process Biochem.*, 65 P

S

-Sisti, (1996) Reduction of dichromate by *Thiobacillus ferrooxidans* *Biotechnology letters*. 24 P.

-Sheng (2008) Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*. 16 P.

-Srivastava et Kowshik, (2013) Evaluation of biosorption potency of *Acinetobacter* sp. for removal of hexavalent chromium from tannery effluent. *Biodegradation*. 18 P.

-Scott et Palmer,(1988) Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnol. Lett.vol* 10. 19 p.

-Scott et Palmer, (1990)Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption.*Appl. Microbiol. Biotechnol.vol* 33. 19 P.

-Silver, (1996) Bacterial Resistances to Toxic Metal Ions. *Rev. Gen.*, P 12

-Sahnouni (2012) Technological characterization of lactic acid bacteria isolated fromintestinalmicrobiota of marine fish in the Oran Algeria coast. *African Journal OfMicrobiologyResearch* 29 P,

-Shanker A K, Cervantes C, Loza-Tavera H etAvudainayagam S. (2005). Chromium toxicity inplants.*Environment International*. 23 P

Références bibliographiques

- Shanker A K, Djanaguiraman M, Sudhagar R, Chandrashekar C N et Pathmanabhan G.(2004)**. Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L) R Wilczek) roots. *Plant Science*.
- Srinath T, Khare S et Ramteke P W. (2001)**. Isolation of hexavalent chromium-reducing Cr-tolerant facultative anaerobes from tannery effluent. *The Journal of General and Applied Microbiology*. p.p 62-66
- Srinath (2001)** Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria: *Chemosphere* 24P
- Suthanthararajan R (2003)**. Membrane application for recovery and reuse of water from treated tannery wastewater. *Desalination*, 65 P
- Sethuraman et Balasubramanian, (2010)** Removal of Cr (VI) from aqueous solution using *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *International Journal of Engineering Science and Technology*, p.p 66-67 .
- Soha et Sahar (2010)** Identification of bacterial strains from tannery effluent and reduction of hexavalent chromium. *Journal of Environmental Biology*. 66 P.
- Shakoori (2000)** Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67 P.
- Singh (2013)**. Detoxification of hexavalent chromium by an indigenous facultative anaerobe *Bacillus cereus* strain isolated from tannery effluent. *African Journal of Biotechnology*. 67 P.

T

- Thatoi H, Das S, Mishra J, Rath B et Das N.(2014)**. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *Journal of Environmental Management*. 24 P
- Thacker U, Parikh R, Shouche Y et Madamwar D. (2006)**. Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. *Process Biochemistry*. 24 P
- Thacker U, Parikh R, Shouche Y, Madamwar D. 2007**. Reduction of chromate by cell-free extract of *Bruceia* sp isolated from Cr (VI) contaminated sites. *Bioresource Technology*. 24P
- Touahir (2023)** Assessment and characterization of heavy metals resistance bacteria isolated in Southwestern Mediterranean coastal waters (Bou-Ismaïl Bay): Impacts of anthropogenic activities. *Laboratory Conservation and Valorization of Marine Resources (CVRM), National Higher School of Marine Sciences and Coastal Management (ENSSMAL), Algiers, Algeria* p.p 39-44-45
- Touahir, (2017)** évaluation et caractérisation de la résistance aux antibiotiques chez des bactéries à gram négatif isolées à partir de milieux et d'animaux aquatiques p.p 39-68
- Ture (2021)** Effects of cage farming on antimicrobial and heavy metal resistance of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, and Iranian *Journal of Fisheries Sciences* 22(3) 2023 614 *Lactococcus garvieae*. *Microbial Drug Resistance* 46 p

V

Références bibliographiques

-**Vavasseur (2003)** Bioremédiation des sols et des eaux : application aux pollutions chimique et nucléaire. Ener. Sant 22 P

-**Vitri et Giownnetti, (2008)**Doping Graphene with Metal Contacts 48 P

-**VLYSSIDES et ISRAILIDES, (1997)** Detoxification of tannery wastewater liquids with an electrolysis system. *Environ. Pollut.*, 65 P

W

-**Wright et Welbourn, (2002)** Environmental Toxicology. 1er édition Cambridge environmental Chemistry Series (Livre 11).Cambridge University Press. 17 p

-**Wakatsuki, (1995)** Metal oxidoreduction by microbial cells. *J. Ind. Microbiol.*vol 14, 20 P..

-**Watanabe, (2001)** Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline chitin hydrolysis by Bacillus circulanschitinase A1. FEBS 22 P

-**Wang, Mori, Komori, Sasatsu, and Toda (1989)** Isolation and characterization of an Enterobacter cloacae strain that reduces Cr (VI) under anaerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology 55 P

X

-**Xu WH, Jian H, Liu Y G, Zeng G M, Li X et Zhang W.(2015)**. Bioreduction of chromate by anisolated *Bacillus anthracis* Cr-4 with Soluble Cr (III) product Water; Air and Soil Pollution, 23 P

-**Xiao (2017)** Isolation and characterization of chromium (VI)-reducing Bacillus sp. FY1 and Arthrobacter sp. WZ2 and their bioremediation potential. Bioremediation Journal, 66 P.

Z

- **Zhao (2000)** Zinc hyper accumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. Plant Cell Environ.vol 23. 17 p.

-**Zayed (2021)** Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. Plant and Soil, 44 P

-**Zhao (2012)** College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Number 180, Xueyuan Street, Huixing Road, Zigong, Sichuan, 643000, People's Republic of China; National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture Sichuan University, Chengdu 610065, People's Republic of China. 48 P.

-**Zahoor et Rehman (2008)** Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater .Journal of Environmental Sciences p.p 62-66

ANNEXE

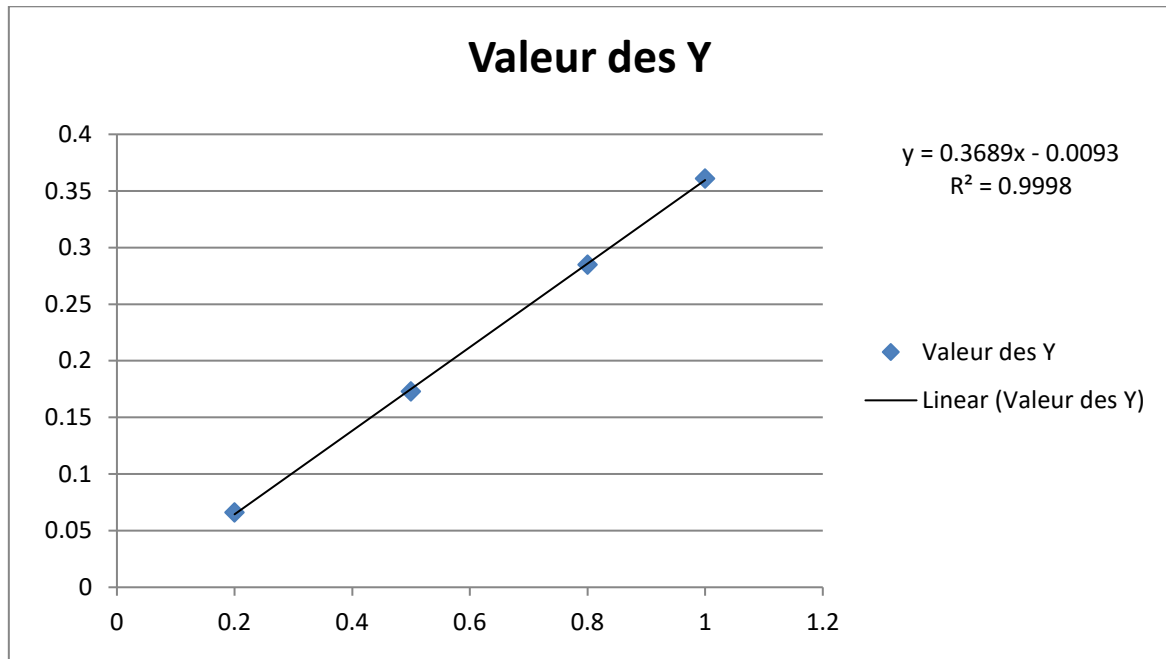


Figure : Courbe d'étalonnage pour différentes concentrations de chrome hexa valent allant de 0.2 à 1mg/l

ملخص

المعادن الثقيلة هي المكون السام الرئيسي لمياه الصرف الصحي من مختلف قطاعات النشاط الصناعي. وجودها في البيئة يؤدي إلى استمرار وانتشار مقاومة المعادن الثقيلة. الهدف الأول لمنهج الدراسة هو تقييم المقاومة البكتيرية للمعادن الثقيلة في البوريات الأحمر والسردين. أظهرت النتائج عدم تمتع وسطية المنخفضة، لكنها المتكشفة عن وجود فرق ذات دلالة إحصائية بين الأسماك من بيئات مختلفة. أظهرت توصيفات الأبرعيسلالة المقاومة المتعددة للسلا لتل المعادن الثقيلة بالإضافة إلى المقاومة المرتبطة بالمضادات الحيوية. تمتدراسة ثلاث سلا لتقاومة (Serratia odorifera R1، Pseudomonas aeruginosa R17 و Staphylococcus aureus S16) لقدرةها على التخلص من الكروم والسادس فيظاظر وفتشغيل مختلف منالرقم الهيدروجيني وكمية اللقاح وتركيز الكروم والأولي. أظهرت النتائج أن السلا لتل ثلاث تأثيرتلاهتماما للتخلص من الكروم وتركيز 200 ملغم/لتر فيدرج حموضة 9 و 7 . . وأن كمية اللقاح لتل منمرحلة الكمونوترسر عملية التخلص من الكروم وفيال 24 ساعة الأولى

الكلمات المفتاحية: المقاومة، المعادن الثقيلة، إزالة الكروم، البكتيريا، السردين، البوريات الأحمر، النفايات الصناعية السائلة

Résumé

Les métaux lourds sont les principaux constituants toxiques des eaux usées de divers secteurs d'activité industrielle. Leur présence dans l'environnement entraîne le maintien et la dissémination de la résistance aux métaux lourds. Le premier objectif de cette étude consiste en l'évaluation de la résistance bactérienne aux métaux lourds chez le rouget et la sardine. Les résultats ont montré des taux moyen à faible mais sont aucune différence significative entre les poissons d'habitats différents. La caractérisation d'une 40aine de souches a montré la multirésistance des souches aux métaux lourds ainsi qu'une résistance associée aux antibiotiques. Trois souches résistantes (*Serratia odorifera R1*, *Pseudomonas aeruginosa R17* et *Staphylococcus aureus S16*) ont été étudiées pour leur potentiel à éliminer le chrome VI dans des conditions opératoires différentes de pH, de quantité d'inoculum et de la concentration initiale du chrome. Les résultats ont montré que les trois souches sont intéressantes pour l'élimination du chrome à une concentration de 200mg/l dans un pH de 9 et 7 et que la quantité d'inoculum réduit la phase de latence et accélère l'élimination du chrome dans les première 24h.

Mots clés : résistance, métaux lourds, élimination du chrome (VI), bactéries, sardine, rouget, effluents des industries.

Abstract

Heavy metals are the main toxic constituents of wastewater from various sectors of industrial activity. Their presence in the environment leads to the maintenance and dissemination of resistance to heavy metals. The first objective of this study consists of the evaluation of bacterial resistance to heavy metals in red mullet and sardines. The results showed medium to low rates but were no significant differences between fish from different habitats. The characterization of around 40 strains showed the multi-resistance of the strains to heavy metals as well as associated resistance to antibiotics. Three resistant strains (*Serratia odorifera R1*, *Pseudomonas aeruginosa R17* and *Staphylococcus aureus S16*) were studied for their potential to eliminate chromium VI under different operating conditions of pH, quantity of inoculum and initial concentration of chromium. The results showed that the three strains are interesting for the elimination of chromium at a concentration of 200 mg/l in a pH of 9 and 7 and that the quantity of inoculum reduces the latency phase and accelerates the elimination of chromium in the first 24 hours.

Key words: resistance, heavy metals, chromium (VI) elimination, bacteria, sardines, red mullet, industrial effluents.

Business Model Canvas

SARL Bio SRAM

Mise en place d'un procédé d'élimination de chrome par "
BIO-DISQUE "

Equipe projet

Encadrée par

Mme Alouache Souhila

Biotechnologie Marine/ENSSMAL

Nom : Nour

Prénom : Yousra

**SP : Biotechnologie
marine**

Nom : Djarir

Prénom : Ikram

**SP : Biotechnologie
marine**



1. Introduction

Plusieurs industries, telles que les tanneries, la métallurgie, de traitement de surface, etc, produisent des quantités significatives d'effluents riches en élément chrome sous sa forme de Cr(VI). Les études ont démontré que les composés de chrome hexavalent sont classés comme étant cancérigènes pour l'homme. Pour se trouver dans la limite de concentration réglementaire, il est important pour les industries de traiter leurs effluents afin de réduire la concentration de l'espèce chromique polluante.

Notre projet prévoit la fabrication et la vente des installations (micro station) d'un procédé biologique basé sur l'utilisation des bactéries immobilisées « Biodisque » pour élimination du chrome.

Cette technologie est un procédé d'épuration mettant en jeu un traitement biologique aérobie à biomasse fixée. Les supports de la microflore épuratrice sont des disques partiellement immergés dans l'effluent à traiter et animés d'un mouvement de rotation pour assurer à la fois la mise en contact des bactéries avec l'effluent, leur oxygénation et le mélange.

2. Activités Clés :

- installation de station de traitement basée sur le procédé biodisque spécifiques pour les effluents chargés en chrome
- maintenance des stations de traitement installées
- production des bio-disques

3. Proposition de valeur :

- élimination de la pollution chromique
- élimination de la pollution organique et azotée et même le phosphore
- épuration des eaux en vue de leur réutilisation
- réduction du coût du traitement par rapport à d'autres procédés
- préservation du réseau d'assainissement collectif
- Procédé concurrentiel et robuste
- Moins d'équipements électromécaniques : un seul moteur par file
- Consommation électrique faible.

4. Ressources clés :

- **Ressources humaines** : 2 Ingénieurs en biotechnologie +1 Ingénieur en génie des procédés +1 Technicien supérieur et une secrétaire

- **Locaux** : bureau + laboratoire de production de biodisques + dépôt du matériel de la station :

Bassins, décanteur-digester, disque biologique, Clarificateur, purge boues du décanteur-digester, purges boues du clarificateur, groupe électrogène, pompes.

5. Les clients potentiels:(en Algérie)

Notre produit peu intéresser un large tissu industriel représenté par environs :

-78 industries de la métallurgie (aciéries, fonderies de fer et d'acier), du bois, de l'aéronautique, chantiers navals, secteurs du transport et de la construction

-11 usines de traitement des surfaces métalliques (chromage dur, galvanoplastie, électroplacage, électrodéposition...)

-23 industries de peinture et de pigments;

-24 industries de textiles

-5 Soudage d'acier et d'alliage – et soudage à l'arc;

- 6 industries de tannage

-20 industries d'électroménagers

-18 entreprises qui travail avec ou à proximité du ciment humide(18)

-13 entreprises de matériaux réfractaires, comme la brique et les mortiers;

6. Canaux de distribution

* Ventes web, plateforme,

* Sur place au niveau du siège de notre entreprise

-Publicité à travers les réseaux sociaux (Tv, Fb, Instagram....)

-les places de marché (comme Amazon, eBay, RueDuCommerce, etc.)

- Sous traitance en partenariat avec un autre fournisseur

7. Relation clients

- Formation du personnel

- Suivi du fonctionnement de la station et maintenance

- La garantie du matériel

- Prix concurrentiel

8. Les concurrents

*EURLSAIMEX TRAITEMENT DES EAUX : importation distribution Installateur et Mainteneur d'équipement de traitement des eaux, Osmose Inverse, Adoucisseur, traitement Chimique. Fournisseur de : Traitement des eaux - appareils et installations | traitement des eaux | adoucisseurs, osmose, déminéralisateurs

-Adresse : ROUIBA ALGERIE TEBESSA 16000 Rouiba Alger – Algérie-Téléphone : 0550131063

*WATER ALGERIAN DESIGN :

Installateur et Mainteneur d'équipement de traitement des eaux, Osmose Inverse, Adoucisseur, traitement Chimique.

-Adresse : A21 Patrimoine Algerois Panorama Kouba Alger 16000 Alger – Algérie

-Téléphone : 0550513837 / 021635974

*TECHN-EAUX :conception, fabrication et installation de stations complètes de traitement des eaux

-Adresse : BARAKI 16210 Alger - Algérie

-Téléphone : 021762400 / 0770903454

9. Les partenaires

*ANAPE (l'Agence nationale d'Appui et de développement de L'entrepreneuriat)

*ASF (Algerian Startup Found)

*Incubateur

*ONA

*SEAAL

*ministères des industries

*Bureaux d'études

*Fournisseurs exemple:

Equipements d'installations : fournisseur aquanil chettia-chlef , Hydraulique

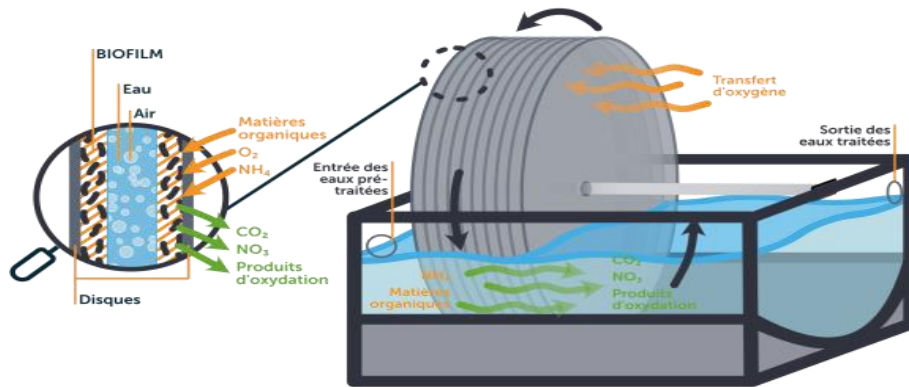
Jijel, Bassins d'élevage el bahri (Cap djenat boumerdes)

-Pompes d'eau medstor (Tebessa)

- **Décanteur** : SARL GOLD METAL TOUALI- Constantine, EURL ETUHP MENANI ALGERIE, Biskra,

- **Disque biologique**:TECHN-EAUX Adresse BARAKI 16210 Alger – Algérie, WATER ALGERIAN DESIGN Kouba Alger 16000 Alger – Algérie

10. Prototypage primaire pour une station destinée aux petites et moyennes entités de capacité entre 21-1000EH (équivalent habitant), consommation d'énergie (faible) (KW) : 1,5 kW. **Garantie** : 10 ans sur réservoir et 2 ans sur équipements



Fonctionnement du bio disque <https://fr.biorotor.com/comment-fonctionne-biorotor/>

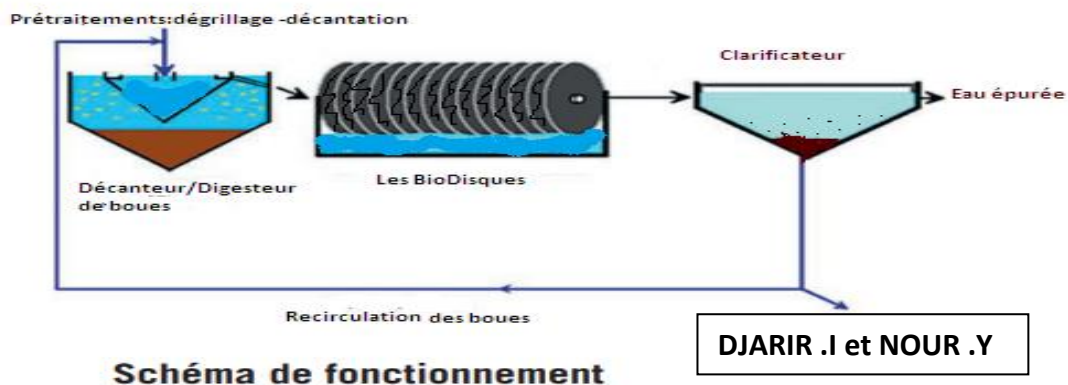
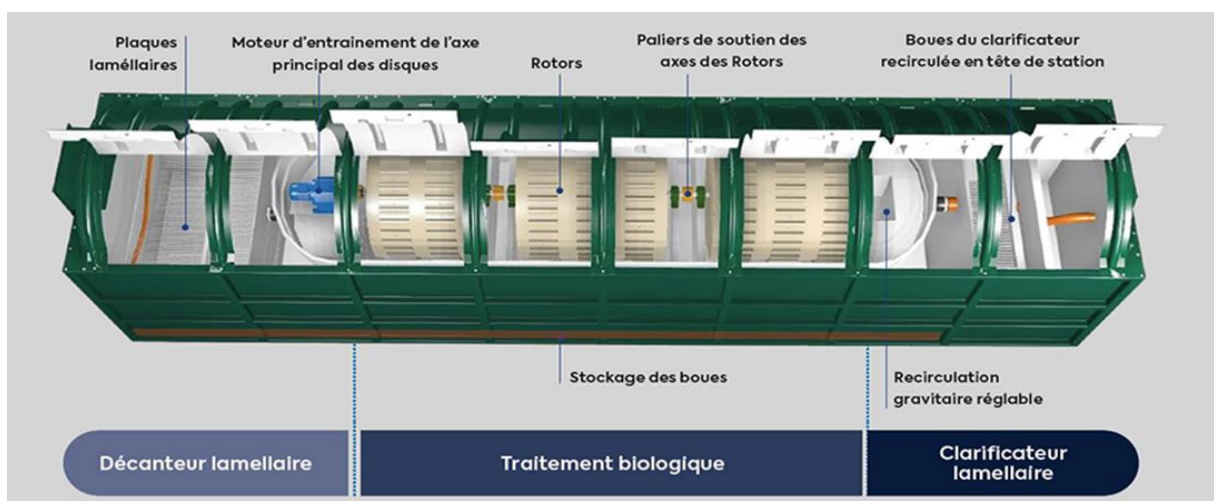


Schéma de fonctionnement



Fonctionnement du installation <https://www.premiertechaqua.com/fr-fr/assainissement-eaux-usees-regroupe/mbr>

11. Estimation Financière

11.1. Estimation économique pour la réalisation du projet

N°	Matériels et matériaux	Nombre d'unité	Prix (DA)
1	Bassin	1	14000
2	Dégrillage	1	30000
3	Disques+Cuve	3 +1	18000
4	Clarificateur	1	30000
5	Purges boues	2	84000
6	Plaque lamellaire	2	20000
7	Moteur	1	250000
8	Rotors	3	16000
9	Pompe	1	17500
	TOTAL		479 500DA

11.2. Estimation économique des coûts fixes et variables

coût	Charge	Le prix par mois (DA)	Par années (DA)
coûts (fixes et variable)	Local	50000	400000
	Electricité	16000	200 000
	Eau	8300	100 000
	Salaires	220 000	2640000
	Transport	16000	192 000
	Marketing	12460	149520
	Autres	833	9996
	Total		323 593DA

11.3. Equipement de bureau et laboratoire

Désignation	Nombre	Prix unitaire
Micro-ordinateur	1	70000
Imprimante	1	20000
Bureau	1	20000
Chaises	2	15000
Armoire de bureau	1	4000
Equipement de laboratoire		300000
Total		429000 DA

11.4. Les ressources humaines :

-Nous avons besoins d'un technicien avec un salaire de 35 000 DA par mois donc 420 000 DApars.

-Ingénieur en génie de procédés avec un salaire de 45000DA par mois donc 540 000 DApars

-Secrétaire avec un salaire de 20.000 DA par mois donc 240000 DA

-2 ingénieurs de laboratoire avec un salaire de 80000 DA

Total des Salaires : **220 000** par mois et**2640000** par ans

11.5. Les ressources financières :

Pour la construction de ce projet du début jusqu'à la mise en production, nécessite une enveloppe financière de **4791616 DA** par ans

11.6. Chiffre d'affaire et revenus du projet :

-Le chiffre d'affaire est représenté par la vente de l'installation complète et des Biodisques.

Pour la première année : la vente de 3 stations (**7586598,17DA**/station) et 3 biodisques supplémentaires estimé à **440000DA/disque** donc un chiffre d'affaire de **24079794,51**

Pour la Deuxième année : la vente de 3 stations (**7586598,17DA**/station) et 6 biodisques supplémentaires estimé à **440000DA/disque** donc un chiffre d'affaire de **48 159 5**

BMC

Business Model Canvas

Conçu pour:

Startup

Conçu par:








Djaririkram/Nour
yousra

Date :

25/09/2023

Version:

X.Y

<p>Partenaires clés </p> <ul style="list-style-type: none"> --ANADE -ASF (algerian startup found) -ONA -SEAL -ministères des industries -Bureaux d'études -fournisseurs(aquanil chettia-chlef, Hydraulique Jijel, medstor (Tebessa), TECHN-EAUX -Alger... -Incubateur d'ENSSMAL 	<p>Activités Clés </p> <p>Installation de stations de traitement des eaux chargées en chrome par le procédé biodisques</p> <ul style="list-style-type: none"> - maintenance des stations de traitement installées - production des biodisques 	<p>Propositions de valeur </p> <p>élimination de la pollution chromique</p> <ul style="list-style-type: none"> - élimination de la pollution organique et azotée -épuration des eaux en vue de leur réutilisation - réduction du coût du traitement par rapport à d'autres procédés - préservation du réseau d'assainissement collectif - Procédé concurrentiel et robuste - Moins d'équipements électromécaniques : un seul moteur par file - Consommation électrique faible. 	<p>Relation Client </p> <ul style="list-style-type: none"> - La Formation du personnel - La garantie du matériel - Prix concurrentiel 	<p>Clients </p> <ul style="list-style-type: none"> -06 industries de tannage -20industries d'électroménagers -23 industries de peinture et de pigments -78 industries de la métallurgie (aciéries, fonderies de fer et d'acier), du bois, de l'aéronautique, chantiers navals, secteurs du transport et de la construction -11 usines de traitement des surfaces métalliques (chromage dur, galvanoplastie, électroplacage, électrodéposition...) -24 industries de textiles -5 Soudage d'acier et d'alliage – et soudage à l'arc; - 18 entités travail avec ou à proximité du ciment humide
<p>Coûts </p> <p>Coûts de instalation(réacteur-pompe-bassin –un moyen de locomotion et de chaleur) 4762116 DA</p> <p>Couts de biodisques 100000 DA</p>		<p>Revenus </p> <p>Revenue par la vente des installations 7586598,1 DA/Stations)</p> <p>Revenue par la vente des biodisques 440000 DA/disque</p>		