



Fès, le 29/06/2013

N° d'ordre : 09/2013

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mlle : Wifak BAHAFID

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Bioremédiation des sols et des eaux pollués : Etude du mécanisme et modélisation de la biosorption du Cr(VI) par des souches de levures

Thèse présentée et soutenue le 29 juin devant le jury composé de

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
IBNSOUDA KORAIKHI Saad	PES	Faculté des Sciences et technique, Fès	Président
FILALI-MALTOUF Abdelkarim	PES	Faculté des Sciences, Rabat	Rapporteur
REMMAL Adnane	PES	Faculté des Sciences, Fès	Rapporteur
AMIRI Saïd	PES	Ecole Nationale d'Agriculture, Meknès	Rapporteur
FAHIM Mohammed	PES	Faculté des Sciences, Meknès	Examineur
IJJAALI Mustapha	PES	Faculté des Sciences et technique, Fès	Examineur
BEKHTI Khadija	PH	Faculté des Sciences et technique, Fès	Examineur
EL GHACHTOULI Naïma	PH	Faculté des Sciences et technique, Fès	Directrice de thèse

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne

Etablissement : Faculté des Sciences et technique de Fès

Résumé de la thèse

La dépollution des sites contaminés par les métaux lourds est une préoccupation majeure visant à limiter leurs risques toxicologiques en raison de l'impact de cette pollution sur l'environnement et la santé.

Dans le but de contribuer à la mise en place de techniques biologiques pour le traitement des sites contaminés par le Cr(VI), trois souches de levures ont été isolées à partir des sites pollués de la région de Fès (Maroc). Ces dernières ont été identifiées par des techniques moléculaires comme étant *Cyberlindnera fabianii* HE650139, *Wickerhamomyces anomalus* HE648168 et *Candida tropicalis* HE650140. Les trois souches présentent une forte résistance à l'égard du Cr(VI) (CMI de 1500 mg/L) et de différents métaux (Cu, Hg, Ni, Co, Pb et Zn). Les cultures de ces souches vivantes et mortes sont capables de réduire le Cr(VI) sous différentes conditions en présentant un optimal de réduction en présence de glucose comme donneur d'électrons, à une concentration initiale de 25 mg/L de Cr(VI), à pH acide et à une température de 30°C. Les cellules immobilisées dans les billes d'alginate ont également présenté une très bonne capacité de réduction du Cr(VI).

Les mécanismes mis en jeu par les trois souches dans la détoxification du Cr(VI) ont été étudiés en utilisant le fractionnement cellulaire, l'ICP-AES, le MEB-EDAX et l'IFTR. Les résultats ont montré que la détoxification du Cr(VI) implique l'adsorption, l'échange d'ions, la réduction enzymatique et chimique du Cr(VI) en Cr(III). Des isothermes d'adsorption selon des modèles théoriques (Freundlich et Langmuir) nous ont permis de confirmer que les trois levures sont des forts biosorbants du Cr(VI).

Des expériences de biolixiviation réalisées en batch ou sur colonnes ont montré la capacité des souches à diminuer la biodisponibilité du Cr(VI) dans le sol. La bioaugmentation de deux effluents (réel et synthétique) enrichis en Cr(VI) par les trois souches a également permis de diminuer les paramètres de pollution notamment le Cr(VI), la DCO, les orthophosphates, les sulfates et l'oxydabilité au permanganate de potassium au niveau de ces effluents.

L'efficacité de la dépollution du sol et des effluents par les trois souches a été confirmée en étudiant la croissance des plantes d'haricot et du trèfle dans les sols et les effluents bioaugmentés.

Les résultats montrent l'importance de l'utilisation de ces trois souches de levures dans des projets de bioremédiation des sites pollués.

Mots clés : pollution, chrome, levures, mécanismes, modélisation, sol pollué, effluents, biolixiviation, bioaugmentation, Bioremédiation.

SOMMAIRE

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Introduction générale ----- 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Etat de l'environnement au Maroc	5
1. Cas de la ville de Fès	6
2. Loi relative à la protection de l'environnement	9
II. Chrome et environnement	9
1. Spéciation du chrome en solution	10
1.1. Chrome hexavalent, Cr(VI)	10
1.2. Chrome trivalent, Cr(III)	11
2. Présence dans l'environnement	12
3. Effets du chrome	14
3.1. Besoins essentiels en chrome	14
3.2. Toxicité Du chrome	14
3.2.1. Chez l'homme et l'animal	14
3.2.2. Chez les végétaux	15
3.2.3. Chez les microorganismes	16
3.2.4. Paramètres influençant la mobilité et la toxicité du Chrome	17
III. Méthodes de dépollution des sites pollués par le chrome	17
1. Traitements physico-chimiques	18
2. Traitements biologiques	19
2.1. Phytoremédiation	20
2.2. Bioremédiation	21
IV. Bioremédiation du Cr(VI)	22
1. Microorganismes impliqués	22
1.1. Bactéries	22

1.2. Levures -----	23
1.3. Algues -----	23
1.4. Champignons -----	24
2. Réactivité des microorganismes vis à vis du chrome -----	24
3. Mécanismes de résistance des microorganismes au Cr(VI) -----	25
3.1. Mutation du système de transport du sulfate -----	26
3.2. Système d'efflux : la protéine ChrA -----	27
3.3. Biosorption du Cr(VI) -----	28
3.3.1. Facteurs influençant l'adsorption -----	30
3.3.2. Isothermes d'adsorption -----	31
3.4. Réduction du Cr(VI) -----	33
3.4.1. Réduction indirecte -----	33
3.4.2. Réduction directe -----	33

MATERIEL ET METHODES

I. Caractérisation des sites d'étude -----	37
1. Sites d'étude et prélèvement des échantillons -----	37
1.1. Choix des sites -----	37
1.2. Prélèvement des échantillons -----	38
2. Analyses physicochimiques des échantillons -----	38
2.1. Mesure de la température et du pH -----	38
2.2. Evaluation de la pollution organique (DCO et DBO ₅) -----	39
2.3. Evaluation de la pollution par les métaux lourds -----	39
II. Isolement, identification et caractérisation des levures résistantes au chrome -----	40
1. Enrichissement -----	40
2. Isolement et purification des isolats -----	41
3. Identification des isolats de levures -----	41
3.1. Caractérisation morphologique et macroscopiques -----	41
3.2. Identification moléculaire -----	41
3.2.1. Extraction de l'ADN génomique -----	42
3.2.2. Amplification de l'ADNr 5.8S par PCR -----	42
4. Caractérisation des isolats de levures -----	45
4.1. Evaluation de la CMI du chrome et d'autres métaux lourds -----	45

4.2. Etude de la toxicité du Cr(VI) vis-à-vis des levures isolés -----	46
4.2.1. Effet du Cr(VI) sur la croissance des isolats -----	46
4.2.2. Effet du Cr(VI) sur la consommation du glucose par les différents isolats -----	46
4.2.3. Analyse des cellules par Microscopie Electronique à Balayage -----	46
4.3. Evaluation de la biodépollution du Cr(VI) -----	47
4.3.1. Milieux utilisés -----	47
4.3.2. Préparation des cellules vivantes et mortes -----	47
4.3.3. Evaluation de la réduction du Cr(VI) par des cellules vivantes -----	48
4.3.4. Evaluation de la réduction du Cr(VI) par des cellules mortes -----	48
II. Optimisation de la réduction du Cr(VI) -----	49
1. Etude de l'effet de la concentration initiale du Cr(VI) -----	41
2. Etude de l'effet du pH -----	41
3. Etude de l'effet de la température -----	41
4. Etude de l'effet des donneurs d'électrons -----	50
5. Etude de l'effet des métaux lourds -----	50
6. Etude de l'effet de l'immobilisation des cellules -----	50
6.1. Préparation cellules immobiles (vivantes et mortes) -----	50
6.1.1. Préparation de la solution d'alginate -----	51
6.1.2. Immobilisation des cellules -----	51
6.2. Evaluation de la détoxification du Cr(VI) par des cellules immobiles -----	51
III. Etude du mécanisme de détoxification du Cr(VI) par les trois souches -----	51
1. Fractionnement des cellules -----	51
1.1. Préparation des fractions cellulaires -----	51
1.2. Localisation de l'activité réductrice du Cr(VI) -----	52
2. Etude de la réduction du Cr(VI) en Cr(III) : Analyse par Spectromètre d'Emission atomique- Plasma couplé d'induction (ICP-AES) -----	52
3. Etude de l'adsorption du Cr(VI) à la surface cellulaire -----	53
3.1. Analyse par la Microanalyse Dispersion des Electrons des rayons X couplée au Microscopie Electronique à Balayage (EDX/MEB) -----	53
3.2. Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) -----	53
3.3. Modélisation des isothermes d'adsorption -----	54
3.3.1. Modèle de Freundlich -----	55
3.3.2. Model de Langmuir -----	55

IV. Bioremédiation de sol pollué	56
1. Traitement de sol (bioaugmentation/biolixiviation)	56
1.1. Prélèvement et préparation du Sol	57
1.2. Lixiviation en batch	57
1.3. Lixiviation sur colonnes de sol	57
2. Evaluation de la bioaugmentation du sol sur la croissance des plantes : Etude en microcosme	58
2.1. Matériel végétal	58
2.2. Etude en microcosme stérile (Boites de Petri)	59
2.3. Etude en microcosme non stérile (Pots sous serre)	59
V. Traitement des effluents par les cellules de levures	60
1. Choix des effluents	60
1.1. Effluent réel	60
1.2. Effluent synthétique	60
2. Traitement des effluents par les trois isolats de levures	61
3. Etude de la toxicité des effluents traités ou non vis-à-vis des plantes	62
VII. Techniques analytiques	62
1. Dosage du Cr(VI) par la méthode au diphényl-carbazide	62
1.1. Préparation des échantillons liquides	62
1.2. Préparation des échantillons solides	63
2. Dosage du chrome total et des autres métaux par ICP-AES	63
2.1. Préparation des échantillons liquides	63
2.2. Préparation des échantillons solides	63
2.3. Dosage par ICP-AES	64
VIII. Analyses statistiques	64

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Caractérisation des eaux et des sols des sites d'étude	66
1. Caractérisation physico-chimiques : température et pH	66
2. Caractérisation de la pollution organique : DCO et DBO ₅	68
3. Caractérisation de la pollution métallique	69
3.1. Teneurs en chrome	70
3.2. Teneurs en autres métaux	72

II. Isolement, identification et caractérisation des souches de levures	75
1. Sélection des levures résistantes au Cr(VI)	75
2. Caractères morphologiques des isolats	75
3. Identification moléculaire des isolats sélectionnés	76
4. Caractéristiques des souches isolées	78
4.1. CMI du chrome et d'autres métaux lourds	78
4.2. Toxicité du Cr(VI) vis-à-vis des microorganismes isolés	80
4.2.1. Effet du Cr(VI) sur la croissance des levures	80
4.2.2. Effet de la concentration initiale du chrome sur la consommation du glucose	82
4.2.3. Analyse des cellules de levures par microscopie électronique à balayage (MEB)	84
4.3. Biodépollution du Cr(VI)	85
4.3.1. Mise au point du milieu de réduction du Cr(VI)	85
4.3.2. Détoxification du Cr(VI) par les cellules vivantes	86
4.3.3. Détoxification du Cr(VI) par des cellules mortes	87
III. Optimisation de la Détoxification du Cr(VI) par les isolats de levures	91
1. Effet de la concentration initiale du Cr(VI)	91
2. Effet du pH	93
3. Effet de la température	96
4. Effet des donneurs d'électrons	98
5. Effet des métaux lourds	100
6. Effet de l'immobilisation des cellules dans des billes d'alginate	103
IV. Mécanisme de la détoxification du Cr(VI)	106
1. Localisation de l'activité réductrice chez les cellules de levures	106
2. Etude de la réduction du Cr(VI)	109
2.1. Analyse du Cr(tot) dans le milieu extracellulaire par ICP : cas des cellules vivantes	109
2.2. Analyse du Cr(tot) dans le milieu extracellulaire par ICP : cas des cellules mortes	112
2.3. Induction de l'activité chromate réductase	114
3. Etude de l'adsorption du Cr(VI)	116
3.1. Analyse des cellules par EDAX	116
3.2. Analyse des cellules par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	118
3.3. Isothermes d'adsorption	124
V. Bioremédiation de sol pollué	130

1. Traitement du sol : biolixiviation/bioaugmentation -----	130
1.1. Lixiviation en batch -----	130
1.1.1. Biolixiviation du sol contaminé par le Cr(VI) -----	131
1.1.2. Biolixiviation du sol contaminé par le Cr(VI), le Cu et le Zn -----	135
1.2. Lixiviation sur colonne -----	138
1.2.1. Biolixiviation du sol contaminé par le Cr(VI) -----	138
1.2.2. Biolixiviation du sol contaminé par le Cr(VI), le Cu(II) et le Zn(II) -----	140
2. Effet de la bioaugmentation du sol sur la croissance des plantes : Etude en microcosme	142
2.1. Effet sur la germination : Microcosme en sol stérile (boîtes de Perti) -----	142
2.2. Effet sur la croissance : Microcosme en sol non stérile (en pots sous serre) -----	145
2.3. Effet sur la morphologie des feuilles : cas particulier des trichomes -----	151
VI. Traitement des effluents -----	155
1. Caractéristiques physico-chimiques des effluents -----	155
2. Effet des souches sur le Cr(VI) dans les effluents (synthétique et réel) -----	156
3. Evolution du pH -----	158
3. Effet des souches sur les différents paramètres de pollution -----	159
3.1. Effet des souches sur la DCO et l'oxydabilité -----	159
3.2. Effet des souches sur les orthophosphates et les sulfates -----	162
4. Tests de toxicité des effluents traités ou non vis-à-vis du trèfle -----	165
Conclusion générale et perspectives -----	170
Références bibliographiques -----	176