



Fès, le 06/02/2014

N° d'ordre 07/2014

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme: Nezha TAHRI JOUTEY

Spécialité : Microbiologie et Biotechnologie Microbienne

Etude des capacités épuratrices de souches bactériennes : vers de nouveaux procédés de bioremédiation des biotopes contaminés par le chrome hexavalent

Thèse présentée et soutenue le 6 Février 2014 devant le jury composé de :

Saad IBNSOUDA KORAICHI	Faculté des Sciences et Techniques-Fès	Président
Abdellatif BOUSSAID	Faculté des Sciences et Techniques-Marrakech	Rapporteur
Abdelkader CHAHLAOUI	Faculté des Sciences- Meknès	Rapporteur
Mohammed MERZOUKI	Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-Fès	Rapporteur
Abdellatif HAGGOUR	Faculté des Sciences et Techniques-Fès	Examineur
Abdellatif BOUKIR	Faculté des Sciences et Techniques-Fès	Examineur
Naïma EL GHACHTOULI	Faculté des Sciences et Techniques-Fès	Directrice de thèse

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de Fès



Résumé

Le chrome hexavalent (Cr(VI)) est utilisé à travers le monde dans plusieurs activités industrielles dont les conséquences sur les écosystèmes terrestres et aquatiques sont de plus en plus préoccupantes. La transformation du Cr(VI) en chrome trivalent (Cr(III)) permet de limiter sa mobilité et sa toxicité et ainsi de réduire ses impacts écotoxicologiques potentiels.

L'objectif de ce travail est de contribuer à la mise en place d'un bioprocédé de décontamination des milieux contenant le Cr(VI). A cette fin, un consortium bactérien a fait l'objet d'une optimisation des conditions de réduction du Cr(VI) (pH, température et taille d'inoculum) par la méthode des plans d'expériences. A partir de ce consortium trois isolats bactériens CRB1, CRB2 et CRB3 sont sélectionnés pour leur résistance et leur capacité à réduire le Cr(VI) et identifiés respectivement comme *Serratia proteamaculans* (HF913431), *Leucobacter chromiireducens* (HE963772) et *Brevibacterium frigoritolerans* (HF937250).

Ces souches montrent une CMI du Cr(VI) de 500, 700 et 400 mg/L respectivement et une multirésistance à d'autres ions métalliques (Cr(III), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Co(II) et Pb(II)). L'étude de la réduction du Cr(VI) par ces bactéries en culture pure a montré une réduction totale de 100 mg/L à pH 7 pour *S. proteamaculans* (CRB1) et *B. frigoritolerans* (CRB3) et à pH 8 pour *L. chromiireducens* (CRB2), en aérobiose à 30 °C, après 48 h. Ces souches sont également capables de réduire le Cr(VI) en présence de différents cations métalliques (Cu(II), Ni(II), Zn(II), Mg(II), Pb(II) et Co(II)) et anions (sulfate, carbonate et nitrate) et en utilisant différents donneurs d'électrons (glucose, glycérol, citrate et pyruvate). L'importance des polyamines (putrescine, spermidine et cadavérine) dans la réponse bactérienne au stress métallique causé par le Cr(VI) est aussi démontrée. L'immobilisation des cellules bactériennes dans des billes d'alginate a augmenté leur capacité à réduire le Cr(VI) et leur réutilisation en continu dans un milieu non renouvelé.

L'étude du mécanisme d'élimination du Cr(VI) par les trois souches en utilisant le fractionnement cellulaire et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a révélé que la réduction du Cr(VI) est constitutive et débute par son adsorption à certains groupes fonctionnels de la paroi cellulaire. L'activité réductrice du Cr(VI) est membranaire pour *S. proteamaculans* (CRB1) alors qu'elle est intracellulaire pour *L. chromiireducens* (CRB2) et *B. frigoritolerans* (CRB3).

Des expériences de biolixiviation de sol en batch et sur colonnes ont montré la capacité des souches à diminuer la biodisponibilité du Cr(VI) dans le sol. Les tests en microcosme ont exhibé le rôle de la bioaugmentation avec les bactéries sélectionnées dans la réduction de la toxicité du Cr(VI) vis-à-vis des plantes et le rôle de *S. proteamaculans* (CRB1) et *B. frigoritolerans* (CRB3) en tant que bactéries promotrices de la croissance des plantes à cause de la production de l'acide indole 3-acétique et de l'activité phosphatase. La bioaugmentation de l'effluent réel et synthétique enrichis par le Cr(VI) avec les trois souches a également permis de diminuer certains paramètres de pollution notamment le Cr(VI), la DCO, les orthophosphates et les sulfates.

Cette approche a donc permis la sélection de souches bactériennes performantes et permet d'envisager leur utilisation dans un procédé de dépollution des effluents et des sols pollués.

Mots clés : Pollution, Cr(VI), réduction, bioremédiation, bioaugmentation, bactéries.

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations et des symboles	

Sommaire

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	
I. Pollution de la ville de Fès : mesures déployées et situation actuelle.....	6
II. Pollution par le chrome.....	9
1. Aperçu économique.....	9
1.1. Historique	9
1.2. Réserves et ressources	9
1.3. Utilisations.....	10
2. Répartition dans l'environnement et sources de pollution	11
2.1. Dans les sols	11
2.3. Dans l'eau et les aliments.....	12
2.4. Normes	13
III. Effets du chrome	13
1. Besoins essentiels	13
2. Toxicité du chrome.....	14
2.1. Chez les microorganismes.....	14
2.2. Chez les végétaux.....	15
2.3. Chez les hommes et les animaux.....	16
IV. Biogéochimie	17
1. Propriétés physico-chimiques du chrome.....	17
1.1. Propriétés physiques.....	17
1.2. Propriétés chimiques	18
2. Etats d'oxydation et spéciation.....	18
2.1. Etats d'oxydation.....	19
2.2. Spéciation du chrome	19
3. Cycle biogéochimique.....	20
4. Mobilité du chrome dans le sol	22
5. Interactions du chrome avec d'autres composés	24
5.1. Réduction du Cr(VI) en Cr(III).....	24
5.2. Oxydation du Cr(III) en Cr(VI).....	25

V. Techniques de dépollution des sites contaminés par le chrome	25
1. Traitements physico-chimiques.....	26
1.1. Traitements physiques.....	26
1.2. Traitements chimiques	26
2. Traitements biologiques	28
2.1. Techniques de bioremédiation.....	28
2.2. Techniques de phytoremédiation.....	30
2.3. Interactions métaux/ microorganismes.....	32
VI. Microorganismes résistants et réducteurs du Cr(VI).....	33
1. Bactéries	33
2. Levures	35
3. Algues.....	35
4. Moisissures.....	36
5. Mycorrhizobactéries promotrices de la croissance des plantes	37
5.1. Champignons mycorhiziens à arbuscules.....	37
5.2. Bactéries promotrices de la croissance des plantes	38
VII. Mécanismes de résistance au Cr(VI) et sa réduction en Cr(III).....	38
1. Mutation du système de transport du sulfate.....	40
2. Systèmes d'efflux : la protéine ChrA	41
3. Mécanismes de réduction du Cr(VI)	43
3.1. Réduction indirecte ou chimique.....	43
3.2. Réduction directe ou enzymatique	44
4. Bioaccumulation.....	45
4.1. Association passive avec la paroi cellulaire ou biosorption.....	46
4.2. Assimilation intracellulaire ou active uptake	47

Matériel et méthodes

I. Sites de prélèvement	48
1. Choix des sites.....	48
2. Prélèvement des échantillons	50
2.1. Echantillons d'eau	50
2.2. Echantillons de sol.....	50
3. Analyses physicochimiques des échantillons.....	50
3.1. Mesure de la température et du pH.....	50
3.2. Détermination des teneurs en ions métalliques	51
II. Isolement des consortia bactériens	53

1. Enrichissement dans des concentrations croissantes de Cr(VI)	53
2. Réduction du Cr(VI) par les suspensions enrichies.....	54
III. Optimisation de la réduction du Cr(VI) par un consortium bactérien	54
1. Modélisation : méthode des plans d'expériences	54
1.1. Choix des paramètres pertinents.....	55
1.2. Principe du modèle.....	55
1.3. Procédure méthodologique d'un plan d'expériences.....	55
1.4. Procédure expérimentale.....	57
2. Effet d'autres paramètres sur la réduction du Cr(VI) par le consortium	59
IV. Isolement, caractérisation et identification des isolats bactériens	59
1. Dénombrement et variations morphologiques des bactéries	59
2. Caractérisation des isolats bactériens	59
2.1. Etude morphologique : aspect macroscopique des colonies	60
2.2. Observation microscopique: Coloration de Gram	60
2.3. Caractérisation biochimique et métabolique	61
3. Etude de la tolérance des isolats bactériens au Cr(VI) et à d'autres ions métalliques.....	63
4. Identification moléculaire.....	63
5. Conservation du matériel biologique.....	68
V. Optimisation de la réduction du Cr(VI) et de la croissance cellulaire des souches en culture pure .	68
1. Effet de l'oxygène (aérobie /anaérobie)	69
2. Effet du pH	69
3. Effet de la température	69
4. Effet des donneurs d'électrons	69
5. Effet des anions	70
6. Effet des cations métalliques	70
7. Effet de la concentration initiale du Cr(VI).....	70
8. Effet des polyamines	71
9. Etude de la réduction du Cr(VI) par les cellules immobilisées	71
VI. Etude du mécanisme d'élimination du Cr(VI)	72
1. Réduction par les cellules au repos «Resting cells»	72
2. Réduction par les cellules perméabilisées « permeabilized cells »	73
3. Fractionnement cellulaire	73
4. Induction de l'activité réductrice du Cr(VI).....	74
5. Etude de l'adsorption.....	74
5.1. Effet de la viabilité cellulaire	74
5.2. Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF).....	74

VII. Bioremédiation de sol contaminé par le Cr(VI).....	75
1. Prélèvement et préparation du sol	75
2. Détermination de l'humidité résiduelle et du poids sec du sol.....	75
3. Expériences de lixiviation	76
3.1. Lixiviation en batch.....	76
3.2. Lixiviation sur colonne.....	77
4. Expériences en microcosme de sol.....	78
4.1. Microcosme en boîtes avec un sol stérile	78
4.2. Microcosme dans les pots avec sol non stérile (sous serre)	78
VIII. Traitement des effluents contaminés au Cr(VI).....	79
1. Choix des effluents.....	79
1.1. Effluent synthétique	79
1.2. Effluent réel	80
2. Traitement des effluents par les souches bactériennes	80
3. Test de phytotoxicité de l'effluent traité	80
IX. Analyses statistiques des résultats.....	81

Résultats et discussions

I. Caractérisation des sites d'isolement	82
1. Caractéristiques des échantillons d'eau.....	82
2. Caractéristiques des échantillons de sol	84
II. Réduction du Cr(VI) par les suspensions enrichies	86
1. Evaluation de la réduction du Cr(VI) au cours des étapes d'enrichissement	86
2. Réduction du Cr(VI) par un consortium bactérien	88
2.1. Optimisation de certains facteurs : modélisation mathématique	89
2.2. Autres facteurs affectant la réduction du Cr(VI) par le consortium bactérien	97
2.3. Dénombrement et variations morphologiques des bactéries	100
III. Caractérisation et identification des isolats bactériens.....	102
1. Caractéristiques des isolats sélectionnés	102
1.1. Caractéristiques macroscopiques.....	102
1.2. Caractéristiques microscopiques : coloration de Gram	103
1.3. Quelques caractéristiques biochimiques et métaboliques	103
2. Identification des souches bactériennes.....	105
2.1. Identification biochimique/ classique.....	105
2.2. Identifications moléculaires des isolats bactériens.....	106
3. Résistance au Cr(VI) et à d'autres ions métalliques.....	108

IV. Optimisation de la réduction du Cr(VI) en solution par les cultures bactériennes pures	111
1. Dénombrement de la biomasse bactérienne	111
2. Effet de différents paramètres sur la réduction du Cr(VI).....	111
2.1. Effet de l'oxygène	111
2.2. Effet du pH	112
2.3. Effet de la température	114
2.4. Effet des donneurs d'électrons	116
2.5. Effet des anions et des cations.....	118
2.6. Effet de la concentration initiale du Cr(VI).....	121
2.7. Effet des polyamines	122
2.8. Réduction du Cr(VI) par les cellules immobilisées.....	128
V. Etude du mécanisme et localisation de l'activité réductrice du Cr(VI).....	131
1. Evolution du Cr(VI), du Cr(III) et du Cr _{tot}	132
2. Effet de la viabilité cellulaire	133
3. Etude de l'adsorption du Cr(VI) : Analyse des cellules par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	134
4. Réduction du Cr(VI) par les cellules au repos et les cellules perméabilisées	138
5. Test avec les fractions cellulaires : Localisation de l'activité	140
VI. Bioremédiation de sol	142
1. Caractéristiques du sol utilisé.....	143
2. Tests de lixiviation	143
2.1. Lixiviation en batch.....	143
2.2. Lixiviation sur colonne.....	148
3. Tests en microcosme : Phytoremédiation assistée de bioaugmentation	150
3.1. Microcosme de sol stérile.....	150
3.2. Microcosme de sol non stérile : Expérience sous serre.....	153
4. Effet du Cr(VI) sur la morphologie des feuilles d'haricot observées au MEB	158
VII. Traitement des effluents.....	160
1. Evolution de la concentration du Cr(VI).....	160
2. Elimination de la matière organique.....	161
3. Evolution des sulfates.....	162
4. Evolution des orthophosphates.....	163
5. Evolution du pH	164
6. Abattement des paramètres de pollution	165
7. Test de toxicité des effluents traités	166
Conclusion générale	170

Perspectives.....	175
Liste des références bibliographiques	178

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de cultures et des tampons.....	203
Annexe II : Réactifs de révélation (galerie Api 20E).....	205
Annexe III : Analyses physicochimiques de l'eau	206
Annexe IV : Résultats des alignements des séquences obtenues avec celles des bases de données ...	207