



Faculté des Sciences et Techniques
Laboratoire de Biotechnologie Microbienne



Mémoire de Fin d'Études Pour l'Obtention Du Diplôme de Master

***Bioremédiation du chrome :
Optimisation des conditions de réduction du Cr(VI)
par deux souches bactériennes et application pour le
traitement de sol et d'effluents contaminés***

Réalisé par :

➤ Soumiya NASSEF

Encadré par :

➤ Pr. Naïma EL GHACHTOULI

Table de matière

Sommaire

Liste des figures et des Tableaux

Résumé

Abstract

<i>Introduction</i>	<i>1</i>
---------------------------	----------

Chapitre I : Revue bibliographique

I.

Chrome	14
---------------------	-----------

1. Propriétés du chrome.....	4
------------------------------	---

1.1. propriété physiques	4
--------------------------------	---

1.2. Propriétés chimiques.....	4
--------------------------------	---

1.2.1. Etats d'oxydation	14
---------------------------------------	-----------

1.2.2 .Spéciation	14
--------------------------------	-----------

2. Réactions du chrome.....	15
-----------------------------	----

2.1. Chrome hexavalent	5
-------------------------------------	----------

2.2. Chrome trivalent	6
------------------------------------	----------

II. Chrome dans l'environnement 6

1. Dans le sol	7
----------------------	---

2. Dans l'atmosphère	7
----------------------------	---

4. Normes	7
-----------------	---

III. Besoins et toxicité du chrome 8

1. Besoins essentiels	8
-----------------------------	---

2. Toxicité du chrome.....	8
----------------------------	---

2.1. Chez l'homme et les animaux	9
---	----------

2.2. Chez les végétaux	10
-------------------------------------	-----------

2.3. Chez les microorganismes	10
--	-----------

IV. Techniques de traitement des sites pollués par le chrome 11

1. Traitements physico-chimiques.....	11
---------------------------------------	----

1.1. Extraction du chrome	11
--	-----------

1.2. Immobilisation du chrome	11
--	-----------

1.2.1. Stabilisation	11
-----------------------------------	-----------

1.2.2. Atténuation naturelle	12
---	-----------

2. Techniques biologiques	12
---------------------------------	----

2.1. Bioremédiation	12
----------------------------------	-----------

2.1.1. Bioaugmentation	13
-------------------------------------	-----------

Table de matière

2.1.2. Biofiltration	13
2.1.3. Biostimulation	13
2.1.4. Biolixiviation.....	14
2.2. Phytoremédiation.....	14
V. Résistance microbienne au chrome et mécanismes de réduction	14
1. Résistance au chrome	14
1.1. Mutation du système de transport du sulfate	14
1.2. Système d'efflux : la protéine ChrA.....	15
2. Réduction du Cr(VI) par les bactéries	16
 <i>Chapitre II : Matériel et Méthodes</i> 	
I. Isolats bactériens	19
II. Evaluation de la résistance au chrome et aux autres métaux	19
III. Etude de la réduction du Cr(VI) et de la croissance	19
1. pH du milieu	19
2. Température.....	20
3. Donneurs d'électrons.....	20
4. Accepteurs d'électrons.....	311
IV. Etude de la réduction du Cr(VI) par les cellules immobilisées	21
1. Préparation des cellules immobilisées.....	21
1.1. Préparation de la suspension bactérienne	21
1.2. Préparation de la solution d'alginate	21
1.3. Réalisation Caviar.....	22
2. Etude de la réduction par les cellules immobilisées en comparaison avec les cellules libres.....	22
3. Etude de la réduction d'une répétition de 100 mg/L par les cellules immobilisées.....	22
V. Etude de la réduction du chrome en microcosme de sol.....	33
1. Microcosme dans les boîtes de Petri	23
2. Microcosme en pots (sous serre)	24
VI. Lixiviation de sol	24
1. Lixiviation en batch.....	24
1.1. Par les cellules libres et immobilisées.....	24
1.2. Par les cellules libres en présence du Cr (VI), du Cu et du Zn	25
2. Lixiviation sur colonnes de sol.....	25
VII. Traitement des effluents	26
1. Site de prélèvement	26

Table de matière

2. Échantillonnage	26
3. Traitement.....	27
4. Dosage des paramètres de pollution.....	37
4.1. Cr (VI).....	27
4.2. Sulfates.....	37
4.3. Orthophosphates.....	28
4.3. Oxydabilité au permanganate de potassium	28
5. Test de toxicité de l'effluent traité.....	29

Chapitre III : Résultats et Discussions

<i>I. Evaluation de la résistance au chrome et aux autres métaux.....</i>	<i>31</i>
<i>II. Optimisation des conditions de croissance et de réductions du Cr(VI)</i>	<i>32</i>
1. Effet du pH	32
2. Effet de la température	33
3. Effet des donneurs d'électrons	34
4. Effet des accepteurs d'électrons	36
<i>III. Réduction du chrome par les cellules immobilisées et les cellules libres</i>	<i>38</i>
1. Comparaison entre les cellules libres et les cellules immobilisées	38
2. Réduction du Cr(VI) par les cellules immobilisées en milieu renouvelé et non renouvelé	39
<i>IV. Réduction du chrome dans un microcosme de sol</i>	<i>40</i>
1. Microcosme dans les boîtes de Petri	40
1.1. Croissance des plantes	40
1.2. Cr(VI) soluble dans le sol	42
2. Microcosme en pots (sous serre)	42
<i>V. Lixiviation de sol</i>	<i>43</i>
1. Lixiviation en batch.....	43
1.1. Par les cellules libres et immobilisées.....	43
1.2. Par les cellules libres en présence du Cr(VI), Cu et du Zn	45
2. En colonne	45
3. Traitement des effluents	47
3.1. Evolution des paramètres de pollution	47
3.2 Effet de l'effluent traité sur la croissance des plantes	49
<i>Conclusion</i>	<i>51</i>

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1: Diagramme de toxicité et mutagenicité du chrome hexavalent (Cheung, 2007).....	9
Figure 2 : Les différents modes hypothétiques du transport du chrome et sa toxicité au niveau des racines des plantes (Shanker et <i>al.</i> , 2004).....	10
Figure 3 : Mécanisme de résistance aux ions CrO_4^{2-} par mutation du système de transport du sulfate (Desjardin, 2002).....	15
Figure 4: Mécanisme enzymatique de la réduction de Cr(VI) en aérobiose et en anaérobiose (Wang et Shen, 1995).....	17
Figure 5: Situation géographique du site de prélèvement.....	26
Figure 6: Effet du pH sur la croissance et la réduction de 100 mg/L du Cr(VI) par les souches E6 (a) et ET (b) en milieu LB à 30°C.....	42
Figure 7 : Effet de la température sur la croissance et la réduction de 100 mg/L du Cr(VI) par les souches E6 (a) et ET (b) en milieu LB à 30°C.....	43
Figure 8 : Effet de différents donneurs d'électrons sur la croissance et la réduction du Cr(VI) (50 mg/L) par les souches E6 (a) et ET (b) en milieu minimum M63.....	35
Figure 9: Réduction du Cr(VI) par la souche E6 en présence de glycérol comme donneur d'électron.....	35
Figure 10 : Effet des accepteurs d'électrons sur la croissance et la réduction du Cr(VI) (100 mg/L) par les souches E6(a) et ET (b) en milieu LB.....	37
Figure 11 : Réduction de 100 mg/L du Cr(VI) par les cellules libres et les cellules immobilisées des souches E6 (a) et ET (b) en milieu LB pH 7 et à 30°C.....	38
Figure 12: Répétition de la réduction de 100 mg/L du Cr(VI) par les cellules immobilisées dans un milieu non renouvelé et un milieu renouvelé des souches E6 (a) et ET (b) en milieu LB à pH 7 à 30°C.....	50
Figure 13: Effet de traitement de sol contaminé par 300 et 400 mg/L du Cr (VI) par les souches ET et E6 sur le poids de la matière fraîche aérienne (PMF air) (a) et racinaire (PMF rac) (b) du trèfle.....	41
Figure 14: Effet de traitement de sol contaminé par 300 et 400 mg/L du Cr (VI) par les souches ET et E6 sur le poids de la matière fraîche aérienne (PMF air) (a) et racinaire (PMF rac) (b) du trèfle.....	53
Figure 16: Répétition de la réduction de 100 mg/L du Cr(VI) par les cellules immobilisées en batch par les souches E6 et ET.....	43
Figure 16: Réduction du Cr (VI) en batch par les souches ET et E6 en absence et en présence de Cu et Zn.....	45

Liste des figures et des tableaux

Figure 17: Réduction du Cr (VI) sur colonne par les souches ET et E6 en absence et en présence de Cu et Zn.....	46
Figure 18: Cinétique d'évolution de la réduction du Cr (VI), d'orthophosphates, de sulfates et d'oxydabilité dans l'effluent réel traité par les souches ET et E6.....	47
Figure 19 : Effet de l'effluent traité par les souches ET et E6 et non traité (T) sur la longueur (a) et le poids (b) de la partie aérienne et racinaire du trèfle.....	49

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales caractéristiques physiques du chrome (Vieweg et al., 1995).....	4
Tableau 2: Concentration minimale inhibitrice de différents métaux sur la croissance des souches ET et E6.....	41
Tableau 3: Cr (VI) soluble dans le sol des boîtes de trèfle et de tournesol, contaminées par 300 mg/L du Cr (VI).....	52

Résumé

Résumé

Le recours au traitement biologique pour la dépollution des sols et des effluents industriels revêt un grand intérêt. Ce travail a pour objectif d'étudier le caractère dépolluant de deux souches bactérienne ET et E6, isolées à partir d'un site pollué par les effluents industriels de la ville de Fès et sélectionnées pour leur capacité de réduction du Cr(VI) toxique et mobile en Cr(III) moins toxique.

Les résultats montrent que les deux souches possèdent une résistance élevée vis-à-vis de plusieurs métaux, avec des degrés de tolérance variables selon la souche et le métal. La réduction optimale du Cr(VI) s'effectue à pH 7- 8 à 30-35°C, en présence de glycérol pour la souche E6 et de fructose pour la souche ET, comme donneur d'électrons.

En outre, l'inoculation par les souches ET et E6 de sol contaminé par le Cr(VI), dans des conditions axéniques et environnementales, a permis de remédier à la toxicité de sol pollué. Ce qui s'est traduit par une meilleure croissance des plantes cultivées sur ce sol, en comparaison avec des plantes témoins non inoculées. De même, la lixiviation, en batch et sur colonne, de sol contaminé a montré que la concentration de Cr(VI) dans les lixiviats des sols traités par les souches étudiées est inférieure à celle dans les lixiviats de sols non traités. Le traitement par ET et E6 d'effluents, prélevés sur oued Fès et enrichis en Cr(VI), a permis de réduire les paramètres de pollution (sulfate, orthophosphates, oxydabilité, Cr(VI)) des ces effluents, ce qui aurait permis de diminuer la toxicité de l'effluent vis-à-vis des plantes de trèfle et de stimuler leur croissance.

Par ailleurs, l'immobilisation des cellules dans des billes d'alginate a permis une meilleure réduction du Cr(VI) aussi bien en milieu LB qu'en présence de sol.

Ainsi, nous avons montré que les souches E6 et ET ont un potentiel d'utilisation dans des projets de bioremédiation de sites pollués par les métaux lourds.

Mots clés : Cr(VI) ; sol ; effluents ; bioremédiation ; bactéries ; lixiviation.

Abstract

The use of the biological treatment for remediation of soil and industrial effluents is of great interest. This work aims to study the depolluting character of two bacterial strains E6 and ET, isolated from a polluted site of industrial waste of the city of Fez and selected for their ability to reduce the toxic and mobile Cr(VI) to the less toxic Cr(III).

The results show that both strains have a high resistance towards several metals, with variable degrees of tolerance depending of the strain and the metal. The optimal reduction of Cr(VI) takes place at pH 7-8 at 30-35°C in the presence of glycerol for E6 and fructose for ET, as electron donors.

Furthermore, inoculation with strains ET and E6, of soil contaminated with Cr(VI) under axenic and environmental conditions, has helped to overcome the toxicity of contaminated soil, which allowed better plants growth on this soil, compared with uninoculated plants. Likewise the leaching, in batch and on a column mode, of contaminated soil showed that the concentration of Cr(VI) in the leachates from soils treated with the studied strains is lower than in the untreated soil leachates. Treatment with ET and E6 effluent, collected from Oued Fez and enriched with Cr(VI), has reduced pollution parameters (sulfate, orthophosphates, oxidizability, Cr(VI)) of these effluents, which would have allowed reducing the toxicity of the effluent with respect to clover and stimulating growth.

Otherwise, the cell immobilization in alginate beads has enabled a greater reduction of Cr(VI) as well in LB media than in the presence of soil.

Thus, we have shown that strains E6 and ET have the potential to use in projects of bioremediation of sites polluted by heavy metals.

Keywords: Cr(VI) ; soil ; effluents ; bioremediation ; bacteria ; leaching.

Introduction

Introduction

La pollution par les métaux lourds est l'un des plus graves problèmes auxquels est confronté notre monde moderne. Ces éléments sont très toxiques et de plus en plus utilisés dans les secteurs industriels. Parmi ces métaux, le chrome a aujourd'hui trouvé un grand nombre d'applications industrielles qui exploitent ses couleurs mais aussi un grand nombre de ses autres qualités qui sont la solidité, la dureté et la résistance à la corrosion ainsi que les capacités oxydantes de certaines de ses formes. Il n'est pas surprenant, compte tenu de toutes ces qualités, que de grandes quantités de chrome soient utilisées dans différents procédés industriels et qu'en conséquence de grandes quantités de déchets chromés soient produites et éventuellement rejetées dans l'environnement, sans aucun traitement.

Dans la nature, le chrome existe sous plusieurs états de valences de -2 à +6, mais c'est surtout sous l'état trivalent (Cr(III)) ou hexavalent (Cr(VI)) qu'on le trouve (Cheung et Ji-Dong, 2007). Le Cr(III) peu toxique est l'état le plus répandu. A l'état de trace, le chrome trivalent est un oligo-élément essentiel pour les êtres vivants (Krishna et Philip, 2005 ; Urvashi et al., 2007). Par contre, le Cr(VI) est très soluble dans l'eau et toxique pour la plupart des organismes en raison de sa nature oxydante forte (Beszedits, 1988) il pénètre rapidement à travers les membranes biologiques puis subit des interactions avec les protéines intracellulaires et les acides nucléiques (Urvashi et al., 2007).

Basés sur ces connaissances, les procédés mis en oeuvre aujourd'hui pour traiter les rejets et les sites pollués par le chrome visent à réduire le Cr(VI) en Cr(III) afin de diminuer ces impacts écotoxicologiques sur l'environnement. En parallèle des méthodes physico-chimiques et électrochimiques existantes qui sont connus pour leur coût élevé et l'élaboration d'une quantité importante de boues difficiles à traiter, de plus en plus de travaux de recherche tentent d'exploiter la capacité de la nature à se régénérer elle-même, et l'aptitude d'adaptation des microorganismes aux environnements les plus hostiles grâce à l'apparition de souches résistantes. Ceci en quête d'un procédé moins coûteux et plus efficace.

Ainsi, notre travail est une contribution à la mise au point d'un bio-procédé pour traiter les sols et les effluents contaminés par ce métal, en utilisant des souches bactériennes isolées du sol de Oued Fès connu par sa contamination par le chrome aussi bien que nombre important de métaux lourds non biodégradables et dangereux.

Le premier volet de ce travail a été consacré à l'étude de la tolérance des souches bactériennes au chrome et à d'autres métaux lourds et à l'optimisation des conditions de croissance et de réduction du Cr(VI) par ces bactéries (pH, température, donneurs et accepteurs d'électrons,

Introduction

immobilisation des cellules dans des billes d'alginate). Le deuxième volet a consisté à l'évaluation des performances de ces souches et la possibilité de leur application dans des procédés de traitement biologique des eaux et des sols pollués (microcosme de sol, lixiviation en batch et sur colonne de sol, effluent réel).

Chapitre I
'Revue Bibliographique'

I. Chrome

1. Propriétés du chrome

1.1. Propriétés physiques

Le chrome est un métal blanc, brillant et non magnétique, il appartient au groupe (VI-B) de la classification périodique des éléments de transition (Arun et al., 2005). Les principales caractéristiques physiques du chrome sont groupées dans le tableau 1.

Tableau 1: Principales caractéristiques physiques du chrome (Vieweg et al., 1995).

Température d'ébullition	Entre 2480 et 2690°C
Température de fusion	1857°C
Densité	7,14
Isotopes naturels non radioactifs	50 (4,31%), 52 (83,76%), 53 (9,55%), 54 (2,38%)
Isotopes radioactifs	De 46 à 49, 51, 55 et 56

1.2. Propriétés chimiques

1.2.1 Etats d'oxydation

Dans la nature, le chrome peut exister sous plusieurs états d'oxydation pouvant aller de -2 à +6 (Garnier, 2009). Les formes les plus couramment rencontrées dans l'environnement sont les formes +3 et +6 (Cr(III) et Cr(VI)). La forme (III) est considérée comme la forme la plus stable (Krishna et Philip, 2005).

1.2.2 Spéciation

La spéciation du Cr(VI) et (III) dépend de plusieurs paramètres comme le pH, leur concentration et la disponibilité en ligand.

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.

- **Le chrome hexavalent, Cr(VI)** : le chrome hexavalent est un puissant oxydant, on le retrouve sous deux formes d'oxyanions qui sont très solubles (H_2CrO_4 et HCrO_4^-).

A de faibles pH proches de 0 ; H_2CrO_4 est l'espèce dominante alors que entre 0,6 et 6, c'est HCrO_4^- , pour des $\text{pH} > 6$; c'est l'ion chromate CrO_4^{2-} qui prévaut (Choo et al., 2006).

Etant donné qu'on ne retrouve pas de pH proche de 0 dans l'environnement seuls HCrO_4^- et CrO_4^{2-} sont présents dans les systèmes naturels.

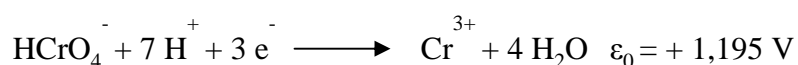
- **Le chrome trivalent Cr(III)** : le chrome trivalent est la forme la plus stable mais ayant des propriétés chimiques plus complexes que le chrome hexavalent. Le chrome trivalent a peu d'affinité pour l'oxygène, c'est pour cette raison qu'il a tendance à former nombre de complexes avec des ligands organiques ou non. Parmi les ligands suivants : OH^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} et NO_3^- ; seul OH^- se complexe de façon significative avec le Cr(III) aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Dans les conditions environnementales courantes, le Cr(III) se retrouve en solution aqueuse sous forme de Cr^{3+} , $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$ et $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$ (Yijun et Hanbin, 2001). Les formes ioniques donnent une coloration verte aux solutions.

2. Réactions du chrome

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).

2.1. Chrome hexavalent

Le chrome hexavalent est un oxydant puissant et peut être facilement réduit en présence d'un réducteur selon l'équation suivante :



Le Cr(VI), sous forme de chromate, peut oxyder la forme réduite de tous les couples dont le potentiel standard est inférieur à 1,195 V. Par conséquent, la réduction du Cr(VI) peut avoir lieu en condition standard 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.

2.2. Chrome trivalent

Si la réduction du chrome hexavalent est possible dans l'environnement dans des conditions réductrices rencontrées dans de nombreux milieux peu oxygénés, l'oxydation de Cr(III) est moins courante car elle exige la présence d'un couple de potentiel redox plus élevé que celui de 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 Cr(OH)₃. Le chrome trivalent ainsi immobilisé physiquement sur la matrice du sol ou bien sédimenté dans les milieux liquides est alors protégé de l'oxydation. A des pH < 5, le Cr(III) est présent sous sa forme cationique et peut s'adsorber sur des sites échangeurs de cations.

L'oxydation du chrome trivalent peut avoir lieu en présence de l'oxygène, l'oxyde de manganèse ou être favorisée par la lumière (oxydation photochimique).

II. Chrome dans l'environnement

Le chrome est présent dans l'environnement de manière ubiquiste. Il a été découvert en 1728 dans un minerai de plomb rouge (crocoite) en Sibérie par le chimiste français Vauquelin (Arun et *al.*, 2005). Le chrome fut utilisé au début de XIX^{ème} siècle dans les procédés de pigmentation aux bichromates. Le chrome a aujourd'hui trouvé un grand nombre d'applications industrielles qui exploitent ses couleurs mais aussi un grand nombre de ses autres qualités qui sont la solidité, la dureté et la résistance à la corrosion ainsi que les capacités oxydantes de certaines de ses formes. Il est très utilisé dans les industries métallurgiques et sidérurgiques pour la fabrication d'alliages ferreux et non ferreux. Ce métal est également utilisé dans l'industrie chimique sous forme de dichromate, comme mordant pour teintures et comme colorant sous forme de sels de chrome. Il est également employé sous forme de sulfate basique de chrome pour le tannage des peaux et des cuirs (Potgieter et *al.*, 2003).

Il n'est pas surprenant, compte tenu de toutes ces qualités, que de grandes quantités de chrome soient utilisées dans différents procédés industriels et qu'en conséquence de grandes quantités de déchets chromés soient produites et éventuellement rejetées dans l'environnement.

1. Dans le sol

La concentration moyenne en chrome de la croûte continentale est de 125 mg/kg avec des valeurs généralement comprises entre 80 et 200 mg/kg (Losi et al., 1994). Les principales réserves se situent en Afrique du Sud, en Turquie, en Iran, aux Philippines et en Finlande.

La thermodynamique indique que le Cr(VI) peut exister de manière naturelle dans les sols. Bien que le Cr(VI) ne soit pas facilement adsorbé sur la plupart des surfaces, il est adsorbé par les minéraux argileux qui possèdent des groupes hydroxyles inorganiques exposés, y compris les oxydes de fer et d'aluminium (Zachara et al., 1989).

2. Dans l'atmosphère

Le chrome hexavalent Cr(VI) et ses composés peuvent être rejetés dans l'air comme sous-produits de la combustion de combustibles fossiles (pour la production d'électricité...) et de différents procédés industriels (fabrication de produits aérospatiaux et de leurs pièces, usines de pâte à papier...) (Potgieter et al., 2003).

Le chrome atmosphérique est associé en majeure partie avec des matières particulaires, en raison d'événements naturels (érosion du sol et du roc, feux de forêt, volcan...) et d'activités humaines. Les teneurs en chrome de l'atmosphère varient selon la localisation. Les concentrations moyennes dans les zones urbaines pouvant atteindre $0,03 \mu\text{g}/\text{m}^3$, valeurs largement dépassées dans des zones d'industrie de l'acier (Losi et al., 1994). Il est éliminé de l'atmosphère autant par les retombées sèches que par les précipitations humides. Le temps de séjour du chrome dans l'atmosphère est évalué à moins de 14 jours (Nriagu et Nieboer, 1988).

3. Dans l'eau et les aliments

Dans les systèmes aquatiques, les chromates ont une bonne solubilité, 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.

La concentration maximale acceptable dans l'eau potable est de 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ selon l'OMS (Organisation Mondiale de Santé). Dans les eaux littorales, la contamination par le chrome est plus importante dans la phase particulaire que dans la phase dissoute. Les fleuves les moins contaminés présentent des concentrations en chrome dissous de l'ordre de 1 à 2 $\mu\text{g}/\text{l}$.

4. Normes

D'après les normes marocaines publiées par l'Office National de L'eau Potable (ONEP) la concentration de chrome total dans l'eau potable ne doit pas dépasser 2 mg/l alors que la concentration du chrome hexavalent ne doit pas dépasser 0,2 mg/l.

Les valeurs limites de chrome dans l'eau potable dans d'autres régions du monde sont :

- 0,1 mg/l pour National Primary Drinking Water Standard
- 0,05 mg/l pour La Recommandation de l'Organisation mondiale de la Santé.
- 0,05 mg/l pour la norme de l'Union européenne (50 microgrammes/litre).
- et 0,05 mg/l pour La qualité de l'eau potable au Canada.

Pour les rejets, l'arrêté du 2 février 1998 fixe la concentration limite de chrome(III) dans les rejets aqueux des industries à 0,5 mg/l si le rejet dépasse 5 g/j, et la concentration limite de Cr(VI) à 0,1 mg/l si le rejet dépasse 1 g/j. Dans le cas des industries de fabrication ou de transformation du chrome, la concentration limite de chrome(III) est fixée à 1,5 mg/l.

Pour le sol et selon les normes canadiennes la concentration maximale est de 100 mg/Kg alors que pour les sols agricoles elle est de 64 mg/Kg (Conseil canadien des ministres de l'environnement, 1997).

III. Besoins et toxicité du chrome

1. Besoins essentiels

A l'état de trace, le chrome trivalent est un oligo-élément essentiel pour les êtres vivants. Il est nécessaire pour la synthèse des corps gras à partir du glucose et aussi pour l'oxydation des graisses en gaz carbonique. Il est nécessaire aussi pour la fonction propre de l'insuline, le principal effet biochimique de la déficience en chrome est la diminution de l'insuline (Krishna et Philip, 2005 ; Urvashi et al., 2006).

2. Toxicité du chrome

Le chrome hexavalent, de part sa solubilité et sa mobilité, s'est trouvé en interaction avec beaucoup d'organismes aquatiques et terrestres sans oublier l'Homme.

2.1. Chez l'homme et les animaux

En principe, l'Homme et l'animal absorbent peu le chrome par inhalation, mais l'essentiel passe à travers les aliments et l'eau potable.

Les organes où la concentration en chrome est la plus élevée sont le foie, les reins, la rate et les os.

La forme hexavalente n'est pas la source nutritionnelle car elle est très toxique et mutagène (Marta *et al.*, 2007). La toxicité du chrome hexavalent vient de sa grande facilité à traverser les membranes biologiques et de ses propriétés de puissant oxydant (Bison *et al.*, 2005).

A doses élevées, le chrome peut être responsable d'intoxications aiguës et chroniques. Il peut être absorbé par voie cutanée ou pulmonaire. Transporté par le sang, il s'accumule au niveau du foie, de l'utérus, des reins et des os. Il est éliminé par voie urinaire.

La figure 1 montre les effets toxiques de Cr(VI) sur les cellules animales ; Une fois à l'intérieur de la cellule ; le Cr(VI) se lie au glutathion et grâce au soufre présent dans cette molécule, il est réduit en chrome (V) puis (IV). Le chrome est alors piégé à l'intérieur de la cellule, le chrome réduit peut alors se lier à l'ADN du noyau et entraîne le pontage entre deux guanines de deux brins d'ADN, ce pontage empêche le déroulement normal de la réplication. La cellule est bloquée en phase « S » du cycle de la mitose (Iraklis *et al.*, 2007).

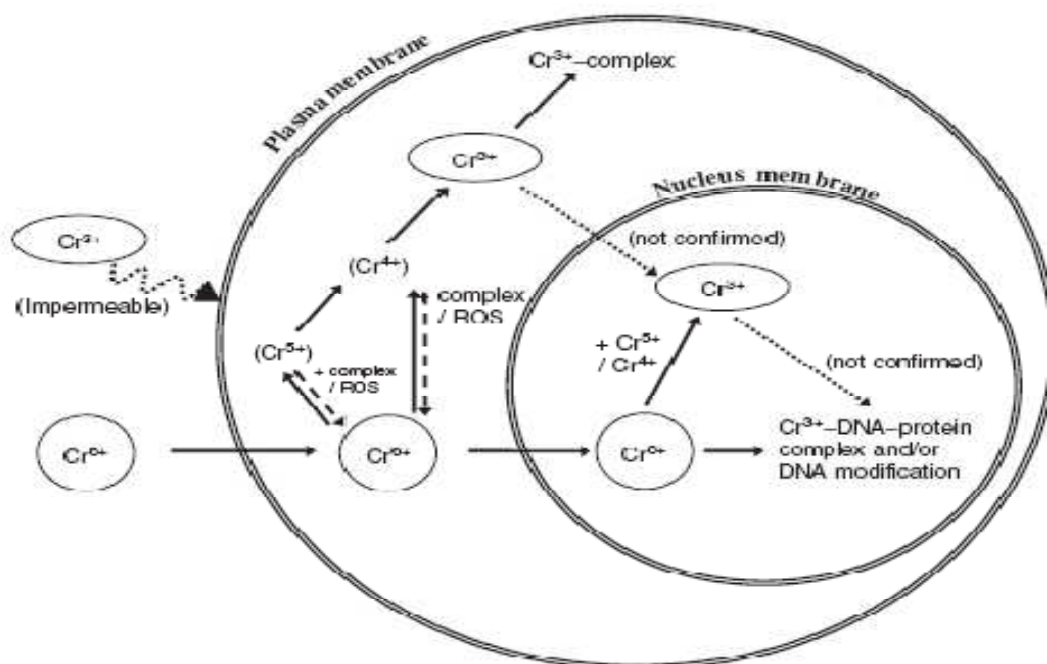


Figure 1: Diagramme de toxicité et mutagenicité du chrome hexavalent (Cheung, 2007).

concentrations, le Cr(VI) a des effets toxiques et mutagènes. 10 à 12 mg de Cr(VI) par litre peuvent inhiber le développement de bactéries du sol alors que les mêmes concentrations en Cr(III) n'ont aucun effet (Ross et al., 1981). Le chrome a un effet toxique sur les bactéries saprophytes et nitrifiantes, sur les champignons filamenteux, les algues et sur le phytoplancton. Le chrome Cr(VI) altère le matériel cellulaire, le métabolisme et les réactions physiologiques.

IV. Techniques de traitement des sites pollués par le chrome

1. Traitements physico-chimiques

1.1 Extraction du chrome

-Lavage du sol : Cette technique permet de récupérer les métaux solubles dont le chrome dans la phase liquide après lavage des terres polluées. On peut utiliser des additifs pour améliorer l'extraction comme des bases, des acides, des surfactants, des agents chélatants. Les métaux, contenus dans la solution de lavage, peuvent être récupérés par des procédés électrochimiques, par précipitation ou échange d'ions, afin que la solution de lavage soit réutilisée. Il faut s'assurer, avant de remettre le sol en place, de l'absence de solution de lavage et de ses additifs dans celui-ci (Mulligan et al., 2001).

-Electromigration : La méthode consiste à extraire le sol et à l'incuber en conditions alcalines afin de limiter l'adsorption des anions chromate entre deux électrodes (Pamukcu, 1992). L'agent alcalinisant neutralise les ions H_3O^+ à l'anode et l'hypochlorite qui est ajouté à la cathode migre vers l'anode et oxyde le chrome qui se trouve sous la forme trivalente. Les essais en laboratoire ont montré que, pour que le rendement du procédé soit intéressant, il faut contrôler les valeurs de pH afin de rester dans la gamme qui favorise la désorption du Cr(VI) (pH supérieur à 8) (Li. et al., 1996). Le facteur limitant de cette technique est le pouvoir tampon du sol qui, s'il est important, limite l'efficacité.

1.2 Immobilisation du chrome

1.2.1 Stabilisation

Le procédé de stabilisation/solidification conduit à l'immobilisation des métaux en incluant les particules de sol auxquels ils sont liés, dans un agent solidifiant (Mench et al., 2000). Ces agents peuvent être la chaux et le ciment. Pour le chrome, la forme hexavalente est réduite avant par ajout d'agents réducteurs ou pendant la phase de mélange avec l'agent stabilisant.

1.2.2 Atténuation naturelle

Il existe dans les sols des agents réducteurs qui peuvent transformer le Cr(VI) en Cr(III). Il s'agit de la matière organique, des acides humiques et fulviques, des ions Fe^{2+} ... L'atténuation naturelle n'est pas une technique utilisable seule mais elle peut l'être en complément d'une autre comme le confinement. En fonction du temps de confinement, des conditions de stockage..., la quantité de Cr(VI) dans le sol pourra évoluer et le traitement consécutif au confinement devra tenir compte de l'atténuation naturelle qui aura éventuellement eu lieu.

2. Techniques biologiques

Les méthodes conventionnelles, pour la décontamination des sols pollués, se basent principalement sur l'excavation du sol contaminé et donc, au lieu de résoudre le problème, le décalent aux générations futures. Par contre, les techniques biologiques (bioremédiation et phytoremédiation) offrent une approche peu coûteuse et soutenable (Kramer, 2005 ; Peuke et Rennenberg 2005).

La bioremédiation, c'est-à-dire l'emploi de procédés biologiques pour éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement. La bioremédiation consiste à utiliser des systèmes biologiques pour réduire le niveau de pollution présents dans l'air, l'eau ou le sol. Ce sont des microorganismes (bioremédiation) ou des plantes (phytoremédiation) qui sont normalement utilisés comme systèmes biologiques.

2.1. Bioremédiation

La bioremédiation du chrome peut se faire par les bactéries, les levures, et les champignons.

La première étude sur la réduction du Cr(VI) par une culture bactérienne a été décrite en 1977 par Romanenko et Koren'kov. La souche isolée a été classée comme étant un *Pseudomonas dechromaticans*. Depuis les années 80, les chercheurs se sont intéressés aux nombreuses autres bactéries capables de réduire le Cr(VI) et proposent des techniques utilisant ces bactéries réductrices de chrome pour le traitement des effluents liquides et plus récemment des sols pollués (Losi et al, 1994).

La résistance et la réduction du Cr(VI) peuvent se rencontrer chez les bactéries gram négatif : *Providencia* sp. (Urvashi, 2006), *Serratia marcescens* (Campos, 2005), *Pseudomonas putida* (Ishibashi, 1990), *Thiobacillus ferrooxidans* (Sisti, 1996), *Ochrobactrum intermedium* CrT-1 (Faisal, 2005), et *Brucella* sp. (Urvashi, 2007) aussi bien que chez les gram positif tel que *Bacillus cereus* S-6 (Faisal, 2005) et *Nesterenkonia* sp. strain MF2 (Amoozegar, 2007).

Certaines bactéries peuvent réduire le Cr(VI) en aérobiose : chez *Thermus scotoductus* SA-01 la chromate réductase est une protéine de 36 kDa qui utilise préférentiellement le NADPH comme accepteur final d'électrons (Diederik, 2008). D'autres peuvent la réaliser en anaérobiose c'est le cas de *Aerococcus* sp. (Thiruneelakantan, 2001).

Les principales technologies utilisées dans la bioremédiation des sites contaminés par les métaux lourds dont le chrome, sont les suivantes (Desjardin, 2002) :

2.1.1 Bioaugmentation

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes à la surface du milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodépollution des contaminants.

Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à détoxifier les composés présents dans le site à dépolluer. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes. Des éléments nutritifs sont généralement apportés dans la solution contenant les microorganismes. Cette suspension de microorganisme est apportée à la surface du sol dans les conditions naturelles ou injectée dans le site contaminé sous pression.

2.1.2 Biofiltration

Consiste à l'utilisation d'un biofiltre pour traiter les émissions gazeuses : Le principe consiste à utiliser des microorganismes pour détoxifier les polluants contenus dans l'air à traiter : la phase aqueuse (l'air contaminé) est mise en contact avec une phase aqueuse dans laquelle se développe la population microbienne.

2.1.3 Biostimulation

Cette technologie consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (présentes dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité).

2.1.4 Biolixiviation

C'est la lixiviation favorisée par la voie biologique (généralement bactérienne). Elle correspond à une méthodologie de solubilisation des métaux lourds grâce à des bactéries acidophiles fonctionnant en présence ou en absence d'oxygène. Deux facteurs sont importants pour la biolixiviation : la température qui doit être comprise entre 25 et 35 °C, la taille des particules qui doivent être très proches de celle des bactéries.

2.2. Phytoremédiation

La phytoremédiation est basée sur la capacité qu'ont certaines plantes à se développer en milieux contaminés, et à extraire, accumuler, stabiliser, volatiliser, transformer ou dégrader un agent polluant donné.

Les plantes utilisent deux stratégies principales, elles peuvent fixer les métaux lourds dans le sol (phytostabilisation) ou importer et stocker les métaux lourds dans les tissus aériens de la plante (phytoextraction).

V. Résistance microbienne au chrome et mécanismes de réduction

Dans les deux cas, le phénomène de résistance au chrome et les mécanismes de réduction du chrome par les micro-organismes, on parle du Cr(VI) qui est la forme la plus toxique et qui peut être éventuellement réduite.

1. Résistance au chrome

Pour résister au Cr(VI), il existe trois grandes stratégies (préventives ou bien curatives): empêcher le Cr(VI) d'entrer dans la cellule (mutation du système de transport du sulfate), le faire ressortir de la cellule s'il y entre (ChrA) ou le réduire en Cr(III).

1.1.Mutation du système de transport du sulfate

La résistance aux chromates peut être due à une mutation chromosomique du système de transport du sulfate (Ohta et al., 1971). Les ions CrO_4^{2-} peuvent pénétrer dans les cellules par le même transporteur que les ions SO_4^{2-} : la sulfate perméase. En effet, les charges des deux ions sont les mêmes et l'encombrement stérique de même grandeur. Chez une cellule sauvage

(non résistante), le système de transport du sulfate est fonctionnel. Par conséquent, les ions chromate peuvent pénétrer dans la cellule et perturber suffisamment le métabolisme. Dans ce cas, la bactérie aura un phénotype sensible (Desjardin, 2002). Lorsque le système de transport du sulfate est muté, les ions sulfate ne peuvent pas pénétrer, pas plus que les ions chromate qui ne peuvent donc pas endommager la cellule. Elle aura dans ce cas un phénotype résistant (Figure 3). Ce mécanisme de résistance a été décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Smith et al., 1995) et chez la bactérie *Streptomyces coelicolor* (Lydiate et al., 1988).

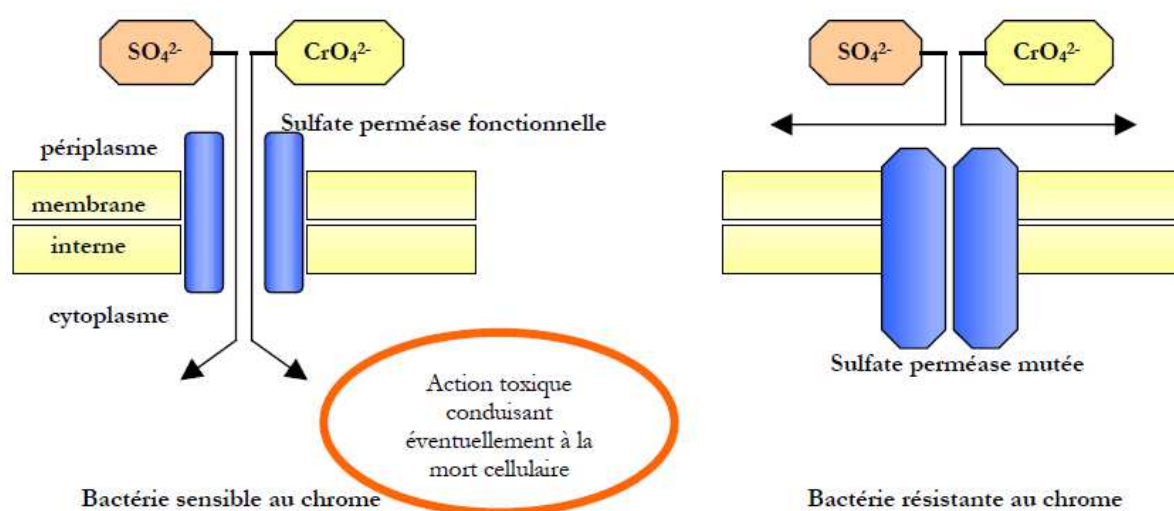


Figure 3 : Mécanisme de résistance aux ions CrO_4^{2-} par mutation du système de transport du sulfate (Desjardin, 2002).

1.2. Système d'efflux : la protéine ChrA

La résistance au chrome chez plusieurs bactéries est liée à la présence d'un plasmide pARI180 chez *Pseudomonas mendocina* (Dhakephalkar et al., 1996), pUM505 chez *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes et Silver, 1992). L'analyse de la séquence de plasmide pUM505 a révélé un ORF (Open Reading Frame) qui code un polypeptide appelé ChrA. Un ORF ou cadre de lecture ouvert est une séquence d'ADN susceptible de coder une protéine ou un polypeptide.

Des expériences sur *Pseudomonas aeruginosa* (Alvarez et al., 1999), ont montré que des vésicules formées à partir de cellules résistantes exprimant ChrA transportent plus de chromates que les vésicules formées à partir de cellules sensibles ne portant pas le gène chrA.

Cet efflux d'ions chromate par ChrA est inhibé par la présence d'ions sulfate suggérant que la protéine ChrA reconnaisse aussi SO_4^{2-} et qu'en excès le sulfate entre en compétition avec le chromate. La protéine ChrA expulserait les ions chromate en utilisant comme source d'énergie le potentiel de membrane. Il apparaît donc que ChrA serait une protéine d'efflux de la membrane qui permettrait de relarguer à l'extérieur les ions chromate (Alvarez et al., 1999).

2. Réduction du Cr(VI) par les bactéries

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).

Ensuite, chez d'autres micro-organismes, il existe la réduction du chrome dite directe car effectuée grâce à des protéines (solubles ou membranaires). Cette réduction peut s'effectuer en présence ou en absence d'oxygène. Ce type de réduction est aussi appelé réduction enzymatique. Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se déroulent rarement sans catalyseur. Ce dernier peut être un ion métallique ou une molécule plus complexe comme le NAD par exemple.

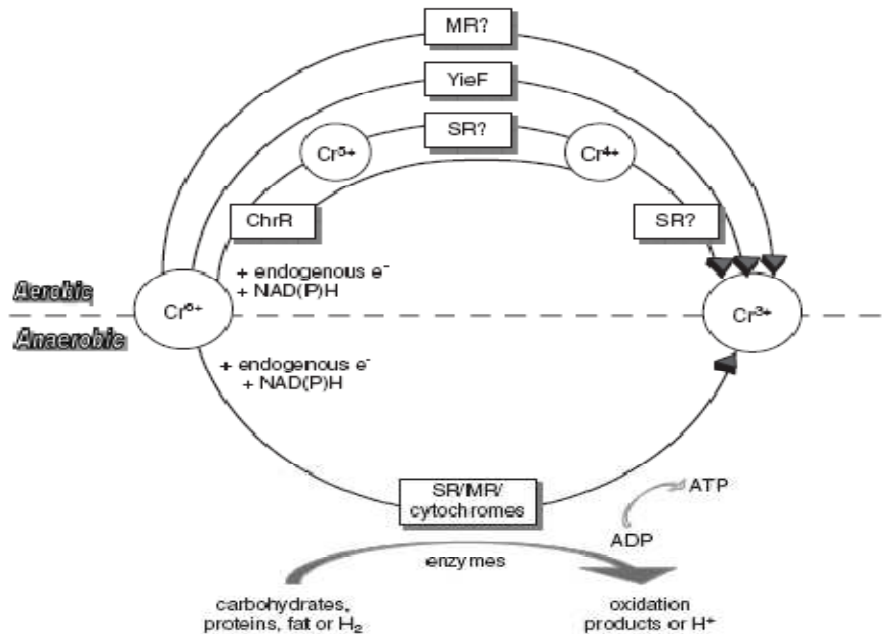


Figure 4: Mécanisme enzymatique de la réduction de Cr(VI) en aérobie et en anaérobie (Wang et Shen, 1995)

En présence d'oxygène, la réduction microbienne de Cr(VI) passe par deux ou trois étapes ; initialement il y a la réduction du Cr(VI) en Cr(V) et/ou Cr(IV) avant la réduction au chrome stable Cr(III). NADH, NADPH et les électrons de réserve endogène sont impliqués comme des donneurs d'électrons dans le processus de réduction de Cr(VI). L'enzyme chromate réductase (Chr) réduit le Cr(VI) avec un seul électron à Cr(V) suivi par le transfert de deux électrons pour produire le Cr(III).

L'enzyme YieF est le seul enzyme qui catalyse la réduction directe du Cr(VI) en Cr(III).

En absence d'oxygène, la réduction de Cr(VI) implique le cytochrome c'est à dire inclut les protéines, carbohydrates, hydrogène, NADH, NADPH et les électrons de réserve endogène. La figure 5 illustre le mécanisme enzymatique de réduction de Cr(VI) en aérobie et en anaérobie (Cheung et Ji-Dong Gu , 2007).

Chapitre II

'Matériel et Méthodes'

I. Isolats bactériens

Deux isolats bactériens : E₆ et E_T (bacilles, Gram positif), sont utilisés dans ce travail. Ils ont été isolés à partir d'un site pollué situé sur Oued Fès à quelques mètres en aval du point de confluence avec Oued Sebou (Tahri, 2008). Ces isolats ont été sélectionnés pour leur capacité à résister et à réduire le chrome (VI) (Tahri et al., 2011).

II. Evaluation de la résistance au chrome et aux autres métaux

Les deux isolats ET et E6 sont ensemencées sur le milieu LB (Luria Bertoni) (annexe) agar contenant des concentrations croissantes de Cr(VI) et d'autres métaux (de 5 à 2000 mg L⁻¹) : Cr(VI), Cr(III), Cu(II), Zn(II), Ni(II), Mn(II) et Co(II), sous forme, de: K₂Cr₂O₇, CrNO₃, CuSO₄, ZnSO₄, NiCl₂, MnSO₄ et CoCl₂ respectivement. Ces métaux lourds ont été stérilisés par filtration et ajoutés séparément au milieu LB agar.

La croissance a été évaluée jusqu'à ce que les souches aient été incapables de produire des colonies sur ce milieu. Sur la base de cette évaluation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée après 48 h d'incubation à 37 °C.

III. Etude de la réduction du Cr(VI) et de la croissance

L'étude de la croissance et de la réduction du Cr(VI) par les deux isolats est réalisée en utilisant deux milieux de culture, selon l'expérience : le milieu riche LB liquide et le milieu M63 (voir annexe). Cette étude est réalisée dans le but d'optimiser les conditions de croissance et de réduction du Cr(VI) par les isolats bactériens (pH du milieu, température, donneurs et accepteurs d'électrons).

1. pH du milieu

Afin d'étudier le profil de croissance et le taux de la réduction de Cr (VI) dans des conditions alcalines et acides, les cultures ont été cultivées à différents niveaux de pH de 4 à 9 dans le milieu LB. Le pH du milieu est ajusté avec NaOH ou HCl.

Le Cr(VI) est ajouté au milieu sous forme de solution de bichromate de potassium à une concentration de 100 mg/L. Le milieu est ensemencé avec 100 µl de culture bactérienne

Matériel et Méthodes

liquide (DO= 1,4- 1.9) des souches étudiées. Les erlenmeyers sont incubés à 30°C sous agitation (125 rpm).

Pour chaque pH un témoin abiotique, non ensemencé, est préparé afin d'évaluer la réduction du Cr(VI) par les constituants du milieu.

Le Cr(VI) restant dans le milieu est dosé par la méthode spectrophotométrique au diphénylcarbazine (DPC) (Philip et al., 1998 ; Shashidhar et al., 2006). 200µl de l'échantillon sont additionnés de 200µl du DPC et 330µl d'H₂SO₄, le volume est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. Le dosage se fait grâce à une réaction colorimétrique avec le DPC qui donne en milieu acide avec l'ion chromique une coloration violette. Ce mélange réactionnel a un maximum d'absorption à 540 nm.

La croissance cellulaire est estimée par mesure de l'absorbance à 600 nm.

2. Température

Différentes températures 25, 30, 37, 40 et 45 C° sont testées sur la croissance et la réduction du Cr(VI) par les isolats bactériens en utilisant le milieu LB additionné de 100 mg/L de Cr(VI) ajusté au pH optimal obtenu pour chaque souche.

L'ensemencement des milieux, les conditions de culture et le dosage du Cr(VI) sont réalisés comme décrit précédemment (III.1).

3. Donneurs d'électrons

Bien que les bactéries réductrices de Cr(VI) puissent utiliser une variété de composés organiques comme donneurs d'électrons pour assurer cette réduction, nous avons testé un certain nombre de ces donneurs d'électrons pour déterminer quel est le meilleur pour nos souches pour avoir une réduction maximale.

Le milieu de culture utilisé pour tester l'effet des donneurs d'électrons sur la croissance et la réduction de chrome par les bactéries est le milieu minimum M63 (annexe).

Les donneurs d'électrons testés sont : le glucose, le fructose, le glycérol, l'acétate de potassium, le citrate de sodium, le NADPH, le tryptophane et l'acide benzoïque.

Les solutions mères des différents donneurs d'électrons sont stérilisées par filtration et additionnées au milieu pour avoir des concentrations de 10 mM.

L'ensemencement des milieux, les conditions de culture et le dosage du Cr(VI) sont réalisés comme décrit précédemment (III.1 page 19).

4. Accepteurs d'électrons

Afin d'étudier le phénomène de réduction du Cr(VI) par les isolats, il était intéressant de connaître si d'autres accepteurs d'électrons souvent présents dans les sites contaminés peuvent entrer en compétition avec le Cr(VI) qui agit tant qu'accepteur d'électrons au cours de sa réduction en Cr(III).

Pour tester l'effet des accepteurs d'électrons sur la réduction le milieu utilisé est le milieu LB et les accepteurs d'électrons testés sont : sulfate de sodium, carbonate de sodium, l'hydrogénophosphate de sodium, nitrate d'ammonium, oxyde de fer(III) et le Chlorure de calcium.

Les solutions mères des différents accepteurs d'électrons sont stérilisées par filtration et additionnées au milieu pour avoir une concentration de 20 mM.

L'ensemencement des milieux, les conditions de culture et le dosage du Cr(VI) sont réalisés comme décrit précédemment (III.1 page 19).

IV. Etude de la réduction du Cr(VI) par les cellules immobilisées

1. Préparation des cellules immobilisées

1.1. Préparation de la suspension bactérienne

Dans des erlenmeyers de 250 ml, 100 ml de milieu LB stérile est ensemencé par les souches E₆ et E_T. Après incubation pendant 24h à 30C° sous agitation de 125 rpm, les cellules sont récupérées par centrifugation dans des tubes de 25 ml avec une vitesse de 7000 Tr/min pendant 10 minutes. Après lavage dans l'eau distillée stérile le culot est suspendu dans 15 ml d'eau distillée stérile.

1.2. Préparation de la solution d'alginate

Pour la préparation d'alginate à 3 %, 0,45g d'alginate est solubilisé dans 15 ml d'eau distillée. La solution est stérilisée pendant 30 min à 121 °C, et mélangée avec la suspension bactérienne qui est déjà préparée.

1.3. Réalisation Caviar

La pâte (alginate de sodium et la suspension bactérienne) est bien malaxée avant d'être prélevé pour faire des billes dans la solution de CaCl_2 0,1M stérile.

Les billes sont immergées dans la solution de CaCl_2 , et sont enfin récupérées et lavées avec de l'eau distillée stérile.

Pour le témoin la préparation des billes est réalisée par l'ajout de 15 ml d'eau distillée stérile à la solution d'alginate.

2. Etude de la réduction par les cellules immobilisées en comparaison avec les cellules libres

Des cultures bactériennes de 24 heures sont centrifugées, les cellules sont récupérées après lavage dans de l'eau distillée stérile. Le culot est utilisé d'une part pour la préparation des cellules immobilisées dans les billes d'alginate, d'autre part pour les cellules libres.

Les cellules immobilisées et les cellules libres sontensemencées dans 50 ml du milieu LB additionné de 100 mg/L du Cr (VI) et incubées à 30°C sous agitation 125 rpm.

Après chaque 24h le dosage du chrome (VI) est fait par la méthode spectrophotométrique au DPC.

3. Etude de la réduction d'une répétition de 100 mg/L par les cellules immobilisées

- **En milieu non renouvelé :** Les cellules immobilisées dans les billes d'alginate sontensemencées dans 50 ml du milieu LB qui contient 100 mg/L du Cr (VI) et incubées à 30°C sous agitation 125 rpm. A chaque fois que la quantité du chrome atteint 0, 100µl de Cr (VI) est ajouté dans le milieu.

Après chaque 24h le dosage du chrome (VI) est fait par la méthode spectrophotométrique au DPC.

- **En milieu renouvelé :** L'expérience est réalisée de la même manière qu'en milieu non renouvelé sauf qu'à chaque fois au lieu d'ajouter le chrome dans le même milieu, les billes

sont lavées et resuspendues dans un autre milieu LB fraîchement préparé et contaminé avec 100 µl du chrome (VI) (100 mg/L). Après chaque 24h le dosage du chrome (VI) est fait par la méthode spectrophotométrique au DPC.

V. Etude de la réduction du chrome en microcosme de sol

Le sol utilisé pour les expériences de microcosme est collecté à partir du jardin de la Faculté des Sciences et Techniques (Fès). C'est un sol argilo-limoneux de pH 6,9. Ce sol est choisi car il n'est pas traité par des produits chimiques, ni exposé à des contaminations par des métaux lourds.

Le sol est prélevé à une profondeur de 20 cm, séché à température ambiante, broyé et tamisé (2 mm de diamètre).

Le sol a été contaminé artificiellement au laboratoire par le Cr(VI) et traité par les souches.

Nous nous sommes intéressés à étudier :

- ✓ L'effet des souches sur la concentration du Cr(VI) soluble dans l'eau.
- ✓ La germination et la croissance des plantes (trèfle, tournesol et haricot) dans un sol préalablement contaminé par le Cr(VI) et traité avec les isolats bactériens.

1. Microcosme dans les boîtes de Petri

Le sol est réparti dans des boîtes de pétri à raison de 35 g par boîte. Ces boîtes sont ensuite stérilisées par autoclavage (30 min-121°C) 5 fois séparées de 24 h pour assurer l'élimination des spores résistants au traitement thermique. Le sol est contaminé par 8 ml des solutions de Cr(VI) à 300 et 400 mg/L (67,5 et 91,42 mg/kg de sol) et inoculé par 8 ml des cultures bactériennes préalablement incubé 48h à 30°C dans le milieu LB.

Des témoins abiotiques sont préparés dans les mêmes conditions. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C. Après 1 semaine :

- la réduction du Cr(VI) dans le sol est évaluée par dosage du Cr(VI) soluble dans l'eau.
- Dans le but d'étudier l'effet du traitement par les isolats bactériens, la toxicité du sol est testée sur la germination et la croissance des plantes de trèfle, de tournesol et d'haricot. Pour ceci, les graines préalablement désinfectées à l'alcool et lavées à l'eau distillée stérile sont mises à germer dans des boîtes de Petri à raison de 10 graines par

Matériel et Méthodes

boite pour le trèfle et de 5 gaines par boîte pour le tournesol et l'haricot. Après 7 jours, le nombre des graines germées est compté, les plantules sont prélevées et les longueurs et les poids des parties aériennes et racinaires sont mesurés. Un dosage du Cr(VI) soluble résiduel dans le sol est réalisé.

2. Microcosme en pots (sous serre)

Des pots en plastiques contenant 150 g de sol sont contaminés par 40 ml d'une solution de chrome à des concentrations de 300 et 400 mg/L et inoculés par 25 ml de culture bactérienne qui est préparée par l'ensemencement de chaque souche dans 100 ml du milieu LB et incubé 48 h à 30°C.

Après une semaine de traitement, des graines de tournesol, de trèfle, et d'haricot sont mises en culture dans les pots.

Les plantes sont prélevées après 20 jours, le nombre des graines germées est compté et les longueurs et les poids des parties aériennes et racinaires sont mesurés.

VI. Lixiviation de sol

1. Lixiviation en batch

1.1 Par les cellules libres et immobilisées

Le sol est tamisé après séchage à l'air ambiant (environ 20°C) pour recueillir la fraction granulométrique inférieure à 2 mm. 5 g de la fraction inférieure à 2 mm du sol sont placés dans des erlenmeyers de 150 ml et stérilisés 3 fois par autoclavage (121°C pendant 30 min). Ce sol est mis en suspension dans 30 ml de milieu LB additionné de Cr(VI) à 100mg/L et ensemencé par les cellules bactériennes libres ou immobilisées dans les billes d'alginat.

Les cellules bactériennes utilisées sont obtenues par centrifugation de 100 ml d'une culture bactérienne dans le milieu LB incubé 48h à 30°C, le culot est suspendu dans 15 ml d'eau distillée stérile pour la préparation des cellules immobilisées ou suspendu directement dans 30 ml du milieu LB pour les cellules libres.

Le témoin est préparé par l'ajout de 30 ml du milieu LB additionné du Cr(VI) à 100mg/L.

L'ensemble est incubé à 30°C, sous agitation (125 rpm).

Chaque 24h, le prélèvement de 1 ml de la solution du sol est réalisé, centrifugé à 7000 Tr/min pendant 5min, et le dosage du Cr(VI) est effectué par la méthode spectrophotométrique au DPC.

Le milieu contient 100 mg/L du chrome (VI) et à chaque fois que la quantité du chrome atteint 0, on rajoute 60 µl (env 100 mg/L) dans le milieu.

1.2 Par les cellules libres en présence du Cr (VI), Cu et Zn

Cette expérience est réalisée de la même manière précédemment décrite, sauf que le milieu LB est additionné par le Cr (VI), le Cu et le Zn à une concentration de 50 mg/L pour chaque métal etensemencé par les cellules libres.

Après 72 heures, la concentration du chrome et celle des autres métaux lourds dans les sols contenant les souches E6, ET et aussi dans les témoins est dosé par le prélèvement de 1 ml des solutions dans des tubes eppendofs, centrifugé à 7000 tr/min pendant 5 min.

2. Lixiviation sur colonnes de sol

Les colonnes utilisées dans cette expérience sont des colonnes d'une longueur de 9 cm ± 0.5 cm et d'une largeur de 3 cm ± 0,5 cm. Chaque colonne a été remplie avec 40 g de sol. Les colonnes sont ensuite préparées pour la lixiviation en ajoutant une couche de gravier de 9g et un filtre nylon avant de compléter par les 40 g du sol. Gravier et filtre ont été préalablement lavés à l'eau distillée. Le gravier assure la cohésion de la base de la colonne du sol tout en permettant une circulation du lixiviat. Il offre en outre une réactivité négligeable vis à vis du lixiviat.

Le filtre nylon quant à lui supporte le poids de l'ensemble. Les colonnes sont polluées avec 15 ml de Cr (VI), de Cu et de Zn à une concentration de 300 mg/L soit 112,5 mg/kg de sol dans chaque colonne.

Ces dernières saturées par la solution de chrome sont laissées sécher pendant une semaine avant d'ajouter 15 ml de la suspension bactérienne dans chaque colonne, préalablement incubée 48h à 30°C. Les colonnes témoins ne contiennent que les polluants et 15 ml de l'eau distillée. Deux répétitions ont été faites.

Après une semaine, la procédure de test de lixiviation consiste à simuler des cycles de pluies avec une solution de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ à 0,001M, et à doser la pollution chromée par la méthode de diphényl carbazil et celle des autres métaux par ICP-AES.

VII. Traitement des effluents

1. Site de prélèvement

Nos échantillons ont été recueillis à partir d'un site pollué par les effluents qui proviennent des rejets industriels de la ville de Fès. Ce site est localisé sur l'Oued Sebou à quelques mètres en aval du point de confluence avec l'Oued Fès.

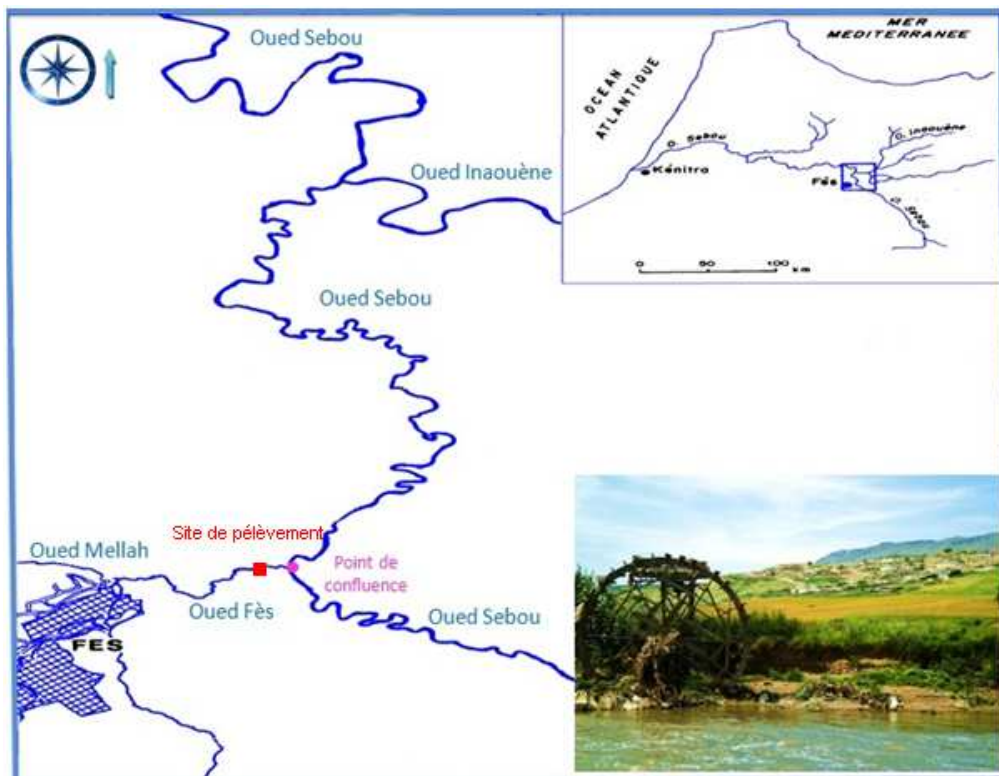


Figure 5: Situation géographique du site de prélèvement des effluents.

2. Échantillonnage

Les échantillons destinés au traitement biologique ont été prélevés dans des flacons en verre stériles, et acheminés au laboratoire dans une glacière à 4°C pour empêcher toute croissance bactérienne (RODIER, 1984).

Le prélèvement des échantillons a été effectué manuellement, le flacon tenu à l'aide d'une main est plongé jusqu'à 20 cm de profondeur, goulot dirigé à contre-courant, selon les recommandations de Rodier (1984). Le flacon rempli d'eau est retiré de l'eau et fermé hermétiquement.

3. Traitement

L'effluent est filtré sur papier Wattman afin d'éliminer les matières en suspension qui sont très abondantes. Le filtrat est réparti dans des erlenmeyers et contaminé par le Cr(VI) à une concentration de 50 mg/L.

Les effluents ainsi enrichis en Cr(VI) sont inoculés par les cellules bactériennes (obtenues par centrifugation de 100 ml de cultures bactériennes de 24 h) et incubés à 30°C sous agitation de 125 rpm.

Des dosages des paramètres de pollution (Cr(VI), sulfates, orthophosphates et oxydabilité au permanganate de potassium) sont effectués après chaque 24 h, après filtration des échantillons sur membrane de nitrocellulose de 0,45 µm.

4. Dosage des paramètres de pollution

4.1. Cr (VI)

Le Cr(VI) est dosé par la méthode spectrophotométrique au DPC.

4.2. Sulfates

Les sulfates sont précipités en milieu acide chlorhydrique sous forme de sulfates de baryum. Le précipité ainsi obtenu est stabilisé à l'aide d'une solution de Tween 20. Les suspensions homogènes sont mesurées au spectrophotomètre.

Dans un erlenmeyer de 150 ml, nous introduisons successivement, 50 ml de l'effluent à analyser, 1 ml de HCl au 1/10 et 5 ml de BaCl₂, le mélange est agité puis laissé reposer pendant 15 min.

La lecture se fait au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650 nm.

Dans les mêmes conditions, un tube témoin a été préparé en remplaçant l'effluent à analyser par de l'eau distillée. Ce témoin, nous a servi au réglage du spectrophotomètre.

Matériel et Méthodes

La courbe d'étalonnage donne directement la teneur en sulfates exprimée en mg de SO₂ par litre d'eau.

4.1. Orthophosphates

En milieu acide et en présence de molybdate d'ammonium, les orthophosphates donnent un complexe phosphomolybdique qui, réduit par l'acide ascorbique, développe une coloration bleue susceptible d'un dosage spectrophotométrique.

Dans un erlenmeyer de 150 ml, nous introduisons successivement ,20 ml de l'effluent à analyser, 1 ml d'acide ascorbique, 4 ml de réactif recombinaison, le mélange est agité puis laissé reposer pendant 30 min.

Dans les mêmes conditions, un tube témoin a été préparé en remplaçant l'effluent à analyser par de l'eau distillée. Ce témoin, nous a servi au réglage du spectrophotomètre.

La lecture se fait au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 700 nm.

La teneur en phosphore, exprimée en mg/l pour la prise d'essai est donnée par la courbe d'étalonnage.

4.2. Oxydabilité au permanganate de potassium

L'indice permanganate d'une eau est la concentration en masse d'oxygène en relation avec la quantité d'ions permanganate consommée par un échantillon d'eau, dans des conditions définies. Il correspond à une mesure conventionnelle pour évaluer la contamination d'un échantillon d'eau faiblement chargé en matières organiques.

Le test consiste à mesurer en milieu acide, la quantité d'oxygène utilisée pour la réduction du permanganate de potassium par les matières oxydables contenues dans une eau.

Dans un erlenmeyer, nous avons prélevé une prise d'essai de 25 ml, puis on a ajouté 5 ml d'acide sulfurique à 196 g/l, mélangé avec précaution. Après on a placé le récipient dans un bain marie pendant 10 minutes puis ajouter 5 ml de la solution mère de permanganate de potassium. Au bout de 10 min nous avons ajouté 5 ml de l'oxalate de sodium et nous avons attendu la décoloration de la solution.

Titrer la solution encore chaude avec la solution fille de permanganate de potassium jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante d'environ 30 secondes. Noter le volume de solution de permanganate consommé, soit V1.

Matériel et Méthodes

Parallèlement à l'essai, procéder à un essai à blanc dans les mêmes conditions mais sur 25 ml d'ED au lieu d'utiliser l'effluent, soit V0 le volume de permanganate de potassium utilisé.

L'indice de permanganate, exprimé en milligrammes par litre d'oxygène, est donné par la formule suivante :

$$\frac{16(V1 - V0)}{V_e}$$

16 : équivalent en oxygène exprimé en milligrammes par millimole, d'une millimole d'oxalate

V0 : volume en millilitres de solution de permanganate de potassium consommé pour l'essai à blanc

V_e : volume en millilitres de solution de permanganate de potassium consommé pour le titre de la solution de permanganate. A partir du blanc, le décolorer en ajoutant l'oxalate de sodium puis retirer avec la solution fille de permanganate de potassium.

5. Test de toxicité de l'effluent traité

Après traitement de l'effluent par nos souches, l'évaluation de ce traitement est faite par l'arrosage des plantes de trèfle qui sont plantées dans des pots contenant 150g de sol.

Deux répétitions ont été réalisées pour chaque souche et le témoin.

Après 20 jours les plantes sont prélevées, le nombre des graines germées est compté et les longueurs et les poids des parties aériennes et racinaires sont mesurés.

Chapitre III

'Résultats et Discussion'

Résultats et discussion

I. Evaluation de la résistance au chrome et aux autres métaux

Les études appliquées portant sur la réduction du Cr(VI) par les bactéries ont pour but de les utiliser dans le traitement d'effluents ou de sols pollués. Toutefois, la pollution au Cr(VI) est souvent associée à d'autres pollutions métalliques. Par conséquent, l'influence de la présence de ces métaux a été testée afin d'apprécier leurs effets sur les souches testées.

Le tableau 2 présente les différentes concentrations minimales inhibitrices de différents métaux pour les souches ET et E6.

Tableau 2: Concentration minimale inhibitrice (CMI) de différents métaux sur la croissance des souches ET et E6.

Souches	CMI des métaux (mg/L)						
	Cr(VI)	Ni	Cr (III)	Mn	Zn	Cu	Co
ET	900	1200	1000	900	1000	1000	1300
E6	700	700	1000	800	800	1000	1300

D'après ce tableau, nous avons constaté que les valeurs des CMI des deux souches diffèrent selon les métaux, allant de 900 à 1300 mg/L pour la souche ET et de 700 à 1300 mg/L pour la souche E6. La souche ET s'est montrée plus résistante que la souche E6 au Cr(VI), au Ni, au Mn et au Zn, mais de point de vue résistance au Cr III), Cu et Co, les deux souches ont une résistance comparable.

Plusieurs travaux ont montré la résistance élevée aux métaux lourds des microorganismes isolés à partir des sites pollués (Viti et al., 2003 ; Zahoor, 2009). Cependant, la comparaison de nos résultats avec les valeurs rapportées dans la littérature est difficile, en raison de différents types de milieux et de conditions de croissance utilisées telles que la nature du milieu liquide ou solide. La disponibilité des composés métalliques est plus importante en milieu liquide qu'en milieu solide, ainsi, la toxicité du métal sur la bactérie est plus élevée en milieu liquide (Shilpi Mitta, 2003). Donc le degré de tolérance aux métaux est plus élevé en milieu solide qu'en milieu liquid (Shilpi Mitta et al, 2003 and Yilmaz EI, 2003).

Gadd (1990) suggère que la capacité de résistance vis-à-vis des métaux lourds diffère d'une souche à une autre selon le mécanisme utilisé par la souche bactériennes pour qu'elle se protège contre l'action de ce métal, comme, la biosorption par la biomasse cellulaire, le transport active, la liaison par des molécules cytosolique, le piégeage dans des capsules cellulaires, les précipitations et des réactions d'oxydoréduction ainsi que la formation

Résultats et discussion

d'adduits protéine-ADN (Zhitkovitch et Costa, 1992) et l'induction de stress protéinique (Ballatori, 1994). En ce qui est de la résistance au chrome hexavalent, trois principaux mécanismes de résistance ont été décrits : la mutation du système de transport du sulfate, le système d'efflux (Desjardin, 2002), et sa réduction en Cr(III) moins toxique.

Ainsi, nos résultats montrent la multirésistance des souches vis-à-vis de plusieurs métaux. Cette résistance serait due à leur adaptation aux conditions environnementales du biotope dans lequel elles ont vécu (Oued Fès, connu par sa contamination par le chrome et aussi bien d'autres métaux lourds).

II. Optimisation des conditions de croissance et de réductions du Cr(VI)

1. Effet du pH

Le résultat de l'effet de pH sur la croissance et la réduction du Cr(VI) par les souches ET et E6 dans le milieu LB est présenté dans la figure 6.

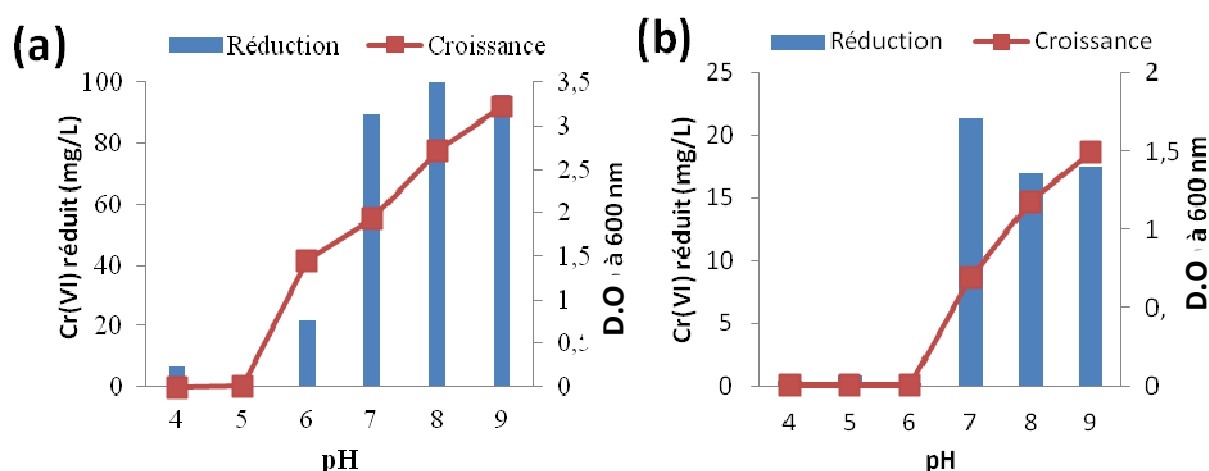


Figure 6: Effet du pH sur la croissance et la réduction de 100 mg/L du Cr(VI) par les souches E6 (a) et ET (b) en milieu LB à 30°C.

La figure 6 (a) illustre la capacité de la souche E6 à réduire le Cr(VI) sur une large gamme de pH (6 à 9), avec un maximum de réduction à pH (7-9) avec 100% de réduction à pH 8. La croissance maximale a été observée à pH 9. Alors qu'à des pH acides nous n'avons noté ni croissance bactérienne ni réduction du Cr(VI).

Nous avons montré que la souche ET (figure 6 (b)) est capable de croître et de réduire le Cr(VI) à des pH neutres et alcalins avec un maximum de réduction à pH 7 et de croissance à pH 9.

Résultats et discussion

Le pH optimal pour la réduction du Cr(VI) dépend d'une souche à l'autre. Wang et al. (1990) ont montré que la réduction du Cr(VI) par *Enterobacter cloacae* s'est produite à des pH de 6,5-8,5 et a été fortement inhibée à pH acides. Shakoori et al. (2000) ont signalé que le pH optimal pour la réduction du Cr (VI) par une bactérie Gram-positif était de 9, mais *Thacker et al.* (2007) ont constaté que le pH optimal est de 7 dans le cas de *Brucella* sp. et *Pseudomonas aeruginosa*.

Nous avons constaté que le pH optimal de la réduction du Cr(VI) ne coïncide pas avec le pH optimal de la croissance pour les deux souches E6 et ET. Des résultats similaires ont été obtenus par Sayel et al. (2011) qui ont montré que le pH optimal pour la croissance d'*Enterococcus gallinarum* est de 8 alors que celui de la réduction est de 10. *Ochrobactrum intermedium* ROSC-5 réduit le Cr (VI) dans un pH de 5 à 9 mais le pH optimal pour la réduction du Cr (VI) a été de 7 (Sultan et Hasnain 2007).

Toutefois, il aurait été intéressant de tester la croissance et la réduction à des pH plus alcalins (pH>9) puisque que les pH alcalins se sont avérés les plus favorables pour la croissance et pour la réduction du Cr(VI) par nos souches. Il semble logique de trouver un tel résultat étant donné que le site d'isolement de ces souches était alcalin (Tahri et al., 2011).

2. Effet de la température

Après avoir étudié l'effet du pH, nous avons jugé nécessaire de déterminer l'influence de la température à la fois sur la croissance et la réduction du Cr(VI) (Figure 7).

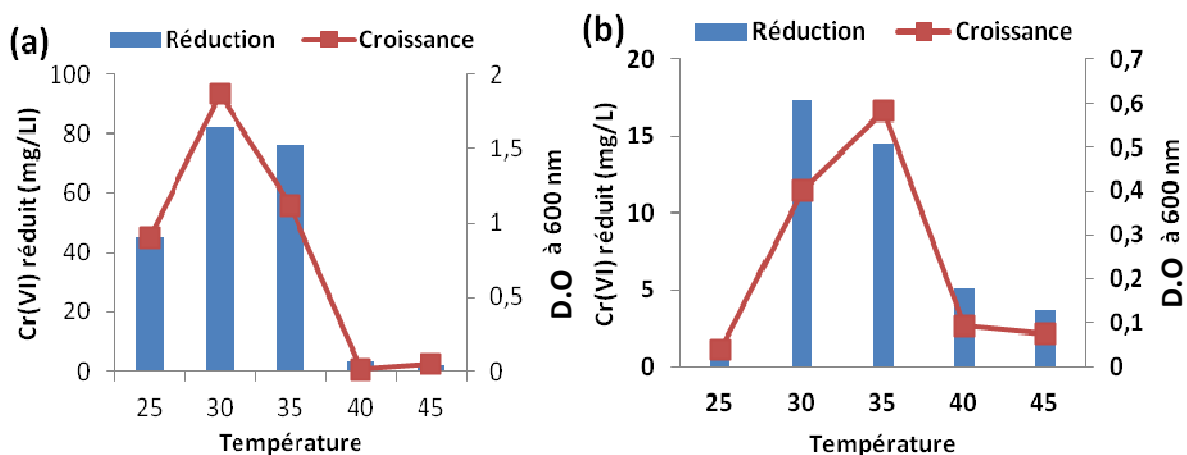


Figure 7 : Effet de la température sur croissance et la réduction de 100 mg/L de Cr(VI) par les souches E6 (a) et ET (b) en milieu LB à 30°C.

Résultats et discussion

La figure 7 représente la cinétique de la croissance et de la réduction du Cr(VI) par les souches E6 et ET, en milieu LB à pH 8 et 7 respectivement et à différentes températures. Ainsi, on remarque que la souche E6 est capable de croître et de réduire le Cr(VI) sur un intervalle de température de 25°C à 35°C avec un optimum de croissance et de réduction à 30°C. Par contre celles-ci sont inhibées à des températures supérieures à 40 °C (figure 7 (a)).

La croissance et la réduction du Cr(VI) par la souche ET (figure 7 (b)) sont possibles à des températures allant de 30 à 45°C avec un maximum de réduction entre 30°C - 35°C et une croissance optimale à 35°C. On note aussi une très faible réduction avec une faible croissance à des températures de 40°C et 45°C.

Il a été rapporté que la température optimale de réduction du Cr (VI) par *Nesterenkonia* sp. MF2 (Amoozegar et al., 2007) et *Ochrobactrum* sp. CSCR-3 (Zhiguo et al., 2009) a été trouvée à 35°C, alors que pour *Bacillus* sp., (Wang et Xiao, 1995) et *Pseudomonas* CRB5 (McLean et Beveridge al., 2000), elle a été signalée à 30°C. Cependant, la chromate réductase obtenue à partir de *Thermus scotoductus* SA-01 a été identifiée avec une température optimale de réduction du Cr(VI) à 65°C (Opperman et al., 2008).

3. Effet des donneurs d'électrons

Les résultats de la réduction du Cr(VI) obtenus en présence de donneurs différents d'électrons pour la souche E6 et ET sont présentés sur la figure 8.

Résultats et discussion

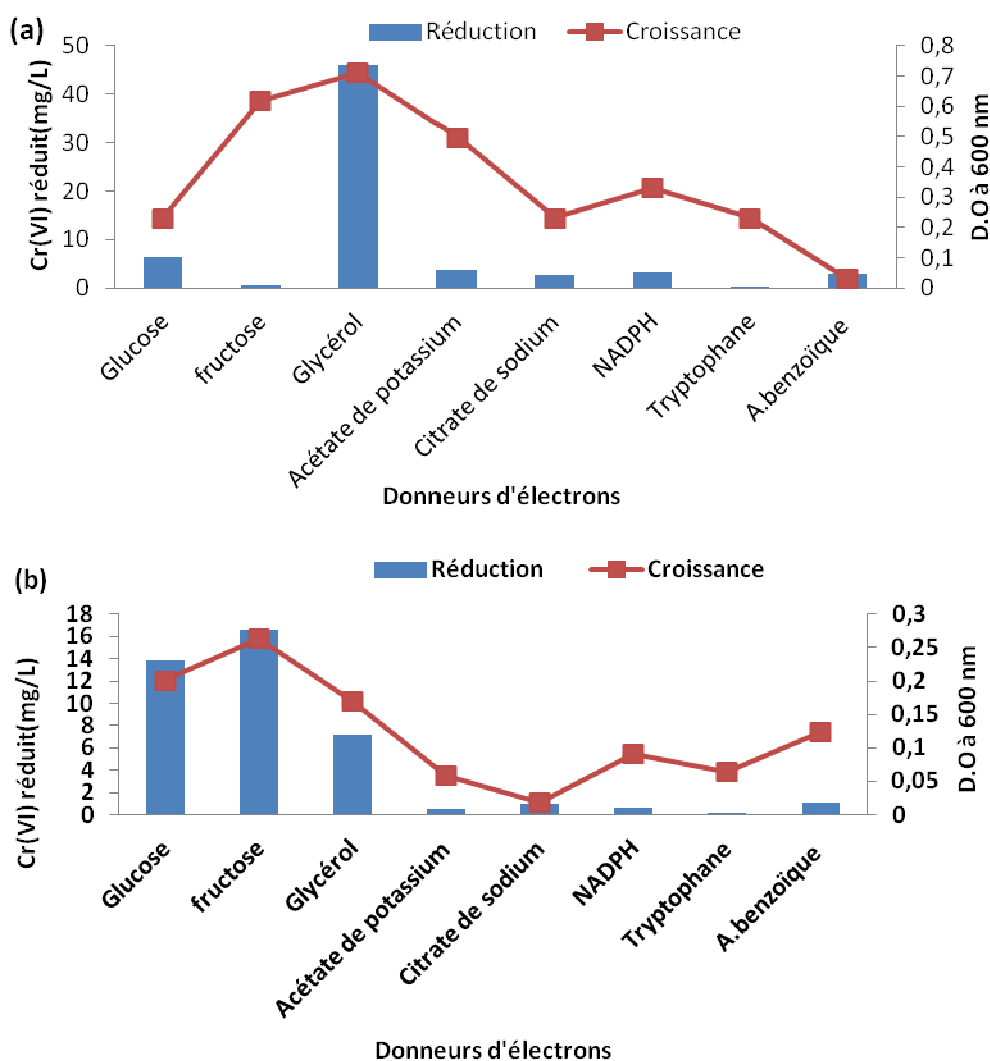


Figure 8 : Effet des différents donneurs d'électrons sur la croissance et la réduction du Cr(VI) (50 mg/L) par les souches E 6 (a) et ET (b) en milieu minimum M63.

Pour la souche E6 (figure 8a), la meilleure réduction, au bout de 48 h, est observée en présence de glycérol (100%), suivie par le glucose avec une réduction de 15%. La croissance est maximale en présence de glycérol suivi par le fructose. Pour la souche ET (figure 8b), nous avons noté une croissance et une réduction importantes en présence de fructose, de glucose et de glycérol. La réduction du Cr(VI) s'est accompagnée par la formation d'un précipité bleu qui serait dû à la formation d'un précipité bleu correspondant à l'hydroxyle de chrome trivalent ($\text{Cr}(\text{OH})_3$) (figure 9).

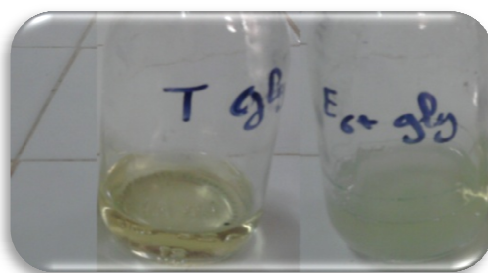


Figure 9 : Réduction du Cr(VI) par la souche E6 en présence de glycérol comme donneur d'électron

Des résultats analogues ont été obtenus avec la souche *Streptomyces* NH50 qui réduisait plus rapidement le Cr(VI) en présence de glycérol qu'en présence de glucose (Desjardin, 2002). Ce résultat peut s'expliquer par l'effet de la nature de la source de carbone sur l'expression de certains gènes de la bactérie. En effet, il existe différents exemples de répression catabolique ou encore "effet glucose" par le glucose dans le monde bactérien. Donc, il est possible que l'activité réductrice du Cr(VI) de la souche E6 soit soumise à l'effet de glucose comme il a été élucidé par (Desjardin, 2002). Contrairement à la souche *Escherichia coli* ATCC 33456 qui a donné une meilleure activité réductrice du Cr(VI) en présence du glucose suivie par le tryptone en comparaison avec l'acétate, citrate, lactate, oxalate, succinate, tartrate, Glycérol, NADH, NADPH, acid Casamino, et casitone en tant que donneurs d'électrons (Woo Chul Bae, 2000).

4. Effet des accepteurs d'électrons

Pour des applications en bioremédiation, il est important de savoir comment différents accepteurs d'électrons peuvent affecter le taux de réduction du Cr(VI), aussi bien que comment le Cr(VI) peut influencer l'utilisation des accepteurs finals d'électrons Cr(VI) (Middleton, 2003).

Les résultats de l'effet de différents accepteurs d'électrons (NH_4NO_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , Fe_2O_3 et CaCl_2) sur la réduction du Cr(VI) et la croissance des souches E6 et ET en milieu LB, sont présentés dans la figure 10.

Résultats et discussion

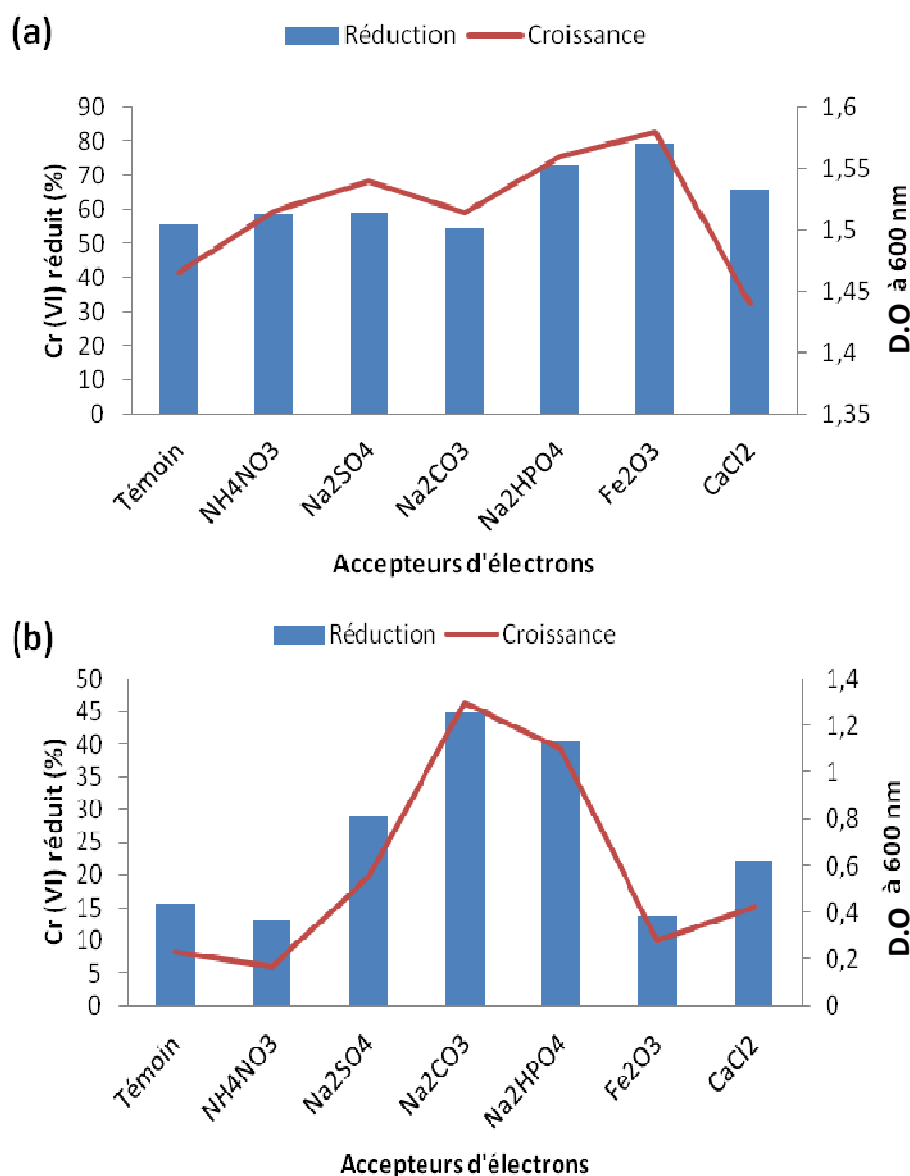


Figure 10 : Effet des accepteurs d'électrons sur la croissance et la réduction du Cr(VI) (100 mg/L) par les souches E6(a) et ET (b) en milieu LB.

Au cours de la réaction de réduction du Cr(VI) en aérobiose, celui-ci agit en tant qu'accepteur d'électrons dans les réactions d'oxydo-réduction :



Donc, quant on parle de la capacité d'une souche à réduire le Cr(VI) en présence d'un donneur d'électron, en d'autres termes ceci implique la capacité du Cr(VI) à accepter les donneurs d'électrons lors de la réduction du Cr(VI) (Middleton, 2003).

La souche E6 (figure 10a) est capable de croître et de réduire le Cr(VI) en présence de tous les accepteurs d'électrons testés avec un pourcentage supérieur ou égal à 58%, mais l'optimum de croissance et de réduction est obtenu avec le Fe2O3 (DO = 1,5 ; 80%). Donc, la

Résultats et discussion

présence d'autres accepteurs d'électrons autres que le Cr(VI) n'affecte pas la réduction du Cr(VI) par la souche E6, ce qui implique que le Cr(VI) est le meilleur accepteur d'électron par rapport aux autres.

Pour la souche ET (figure 10b) la réduction du Cr(VI) est maximale en présence de Na_2CO_3 (45%) suivi par le Na_2HPO_4 (40%) puis le Na_2SO_4 (30%). On constate également que la croissance est en parfaite corrélation avec la réduction en présence de ces trois accepteurs d'électrons. Pour les autres accepteurs d'électrons CaCl_2 , Fe_2O_3 et NH_4NO_3 , nous obtenons graduellement des réductions de 22%, 13,7% et 13%.

Il est important de signaler pour les deux souches étudiées, la réduction du Cr(VI) n'a pas été affectée par la présence du sulfate qui est reconnu comme analogue structural du chromate, de plus les deux souches ont pu donner une croissance dans le milieu M63 ne contenant que le sulfate comme seule source de soufre. Donc le mécanisme de résistance de ces souches vis-à-vis du Cr(VI) n'est pas la mutation du système de transport du sulfate plutôt que sa réduction en Cr(III) moins toxique pour les cellules.

III. Réduction du chrome par les cellules immobilisées et les cellules libres

1. Comparaison entre les cellules libres et les cellules immobilisées

Dans le but d'optimiser les conditions de la réduction du Cr(VI), nous avons étudié cette réduction par les cellules libres et immobilisées des souches E6 et ET. Les résultats observés sont présentés dans la figure 11.

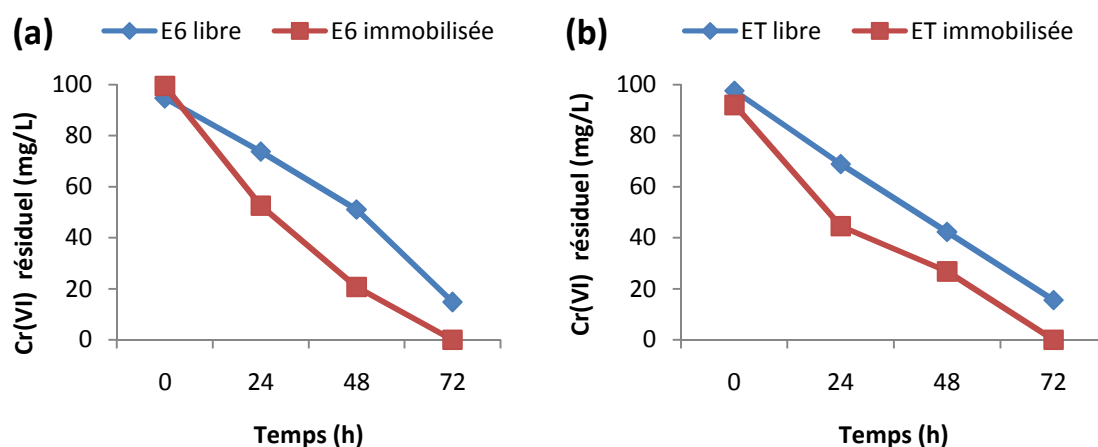


Figure 11 : Réduction de 100 mg/L du Cr(VI) par les cellules libres et les cellules immobilisées des souches E6 (a) et ET (b) en milieu LB pH 7 et à 30°C.

Résultats et discussion

Au bout de 48h les cellules immobilisées de la souche E6 (figure 11(a)) ont permis une réduction de 80% alors que les cellules libres n'ont permis que la réduction de 49%, et après 72h nous avons obtenu une réduction totale par les cellules immobilisées et 86% par les cellules libres.

Pour la souche ET (figure 11(b)), au bout de 48h, nous avons obtenu une réduction de 74,2% et 58% respectivement par les immobilisées et libres, alors qu'après 72h, nous avons obtenu une réduction de 100% par les immobilisées et de 84,4% par les cellules libres.

Ainsi, pour les deux souches E6 et ET, les cellules immobilisées arrivent à réduire le Cr(VI) en une durée plus courte que celle observée par les cellules libres. Ceci peut être expliqué par les avantages que présentent les cellules immobilisées par rapport aux cellules libres notamment la stabilité biologique et physique des cellules en raison de la protection par le support d'alginate et la protection contre certains effets inhibiteurs dans le milieu (toxicité du Cr(VI)).

2. Réduction du Cr(VI) par les cellules immobilisées en milieu renouvelé et non renouvelé

Les résultats de la réduction de répétitions de 100m/L de Cr(VI) par les cellules immobilisées dans un milieu renouvelé et dans un milieu non renouvelé sont présentés dans la figure 12.

Résultats et discussion

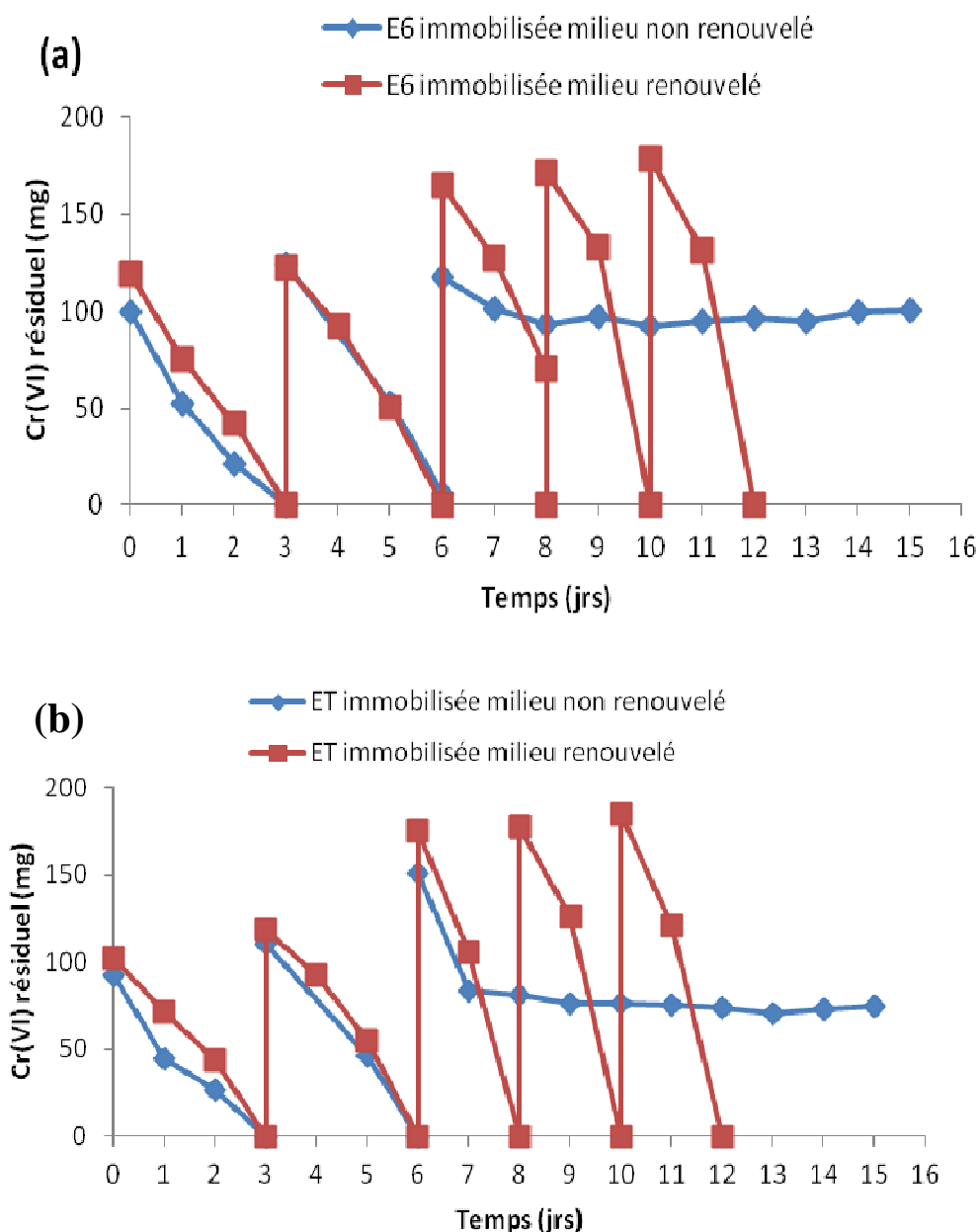


Figure 12: Répétition de la réduction de 100 mg/L du Cr(VI) par les cellules immobilisées dans un milieu non renouvelé et un milieu renouvelé des souches E6 (a) et ET (b) en milieu LB à pH 7 à 30°C.

Les résultats obtenus d'après cette étude montrent que la réduction dans un milieu non renouvelé est maintenue constante après la deuxième répétition pour les deux souches E6 et ET. Alors que la réduction dans un milieu renouvelé est obtenue chaque 48h après la période d'adaptation au milieu, les premiers 6 jours et ceci est observé pour les deux souches. Des travaux analogues ont montré que les cellules de *Streptomyces griseus* immobilisées dans les billes d'alginate ont été utilisées jusqu'à cinq cycles pour la réduction de 0,48 mM (50

Résultats et discussion

mg/L) de Cr(VI) pendant chaque cycle de 24h, tandis que les cellules libres ne pouvaient pas être utilisées plus d'un cycle en raison de la lyse cellulaire (Poopal et Laxman, 2009).

L'immobilisation de cellules présente des avantages par rapport aux cellules libres en étant plus stable, plus facile de re-utilisation, plus facile de séparation solide-liquide.

IV. Réduction du chrome dans un microcosme de sol

1. Microcosme dans les boîtes de Petri

1.1. Croissance des plantes

la capacité des souches à réduire le Cr (VI) dans le sol est évalué par la mesure de la croissance des plantes (trèfle, tournesol haricot) dans des boîtes contenant du sol stérile, contaminé par 300 et 400 mg/L et traités pendant une semaine par les souches E6 et ET.

Les résultats des mesures des poids des parties aériennes et racinaires des plantes de trèfle sont présentés dans la figure 13.

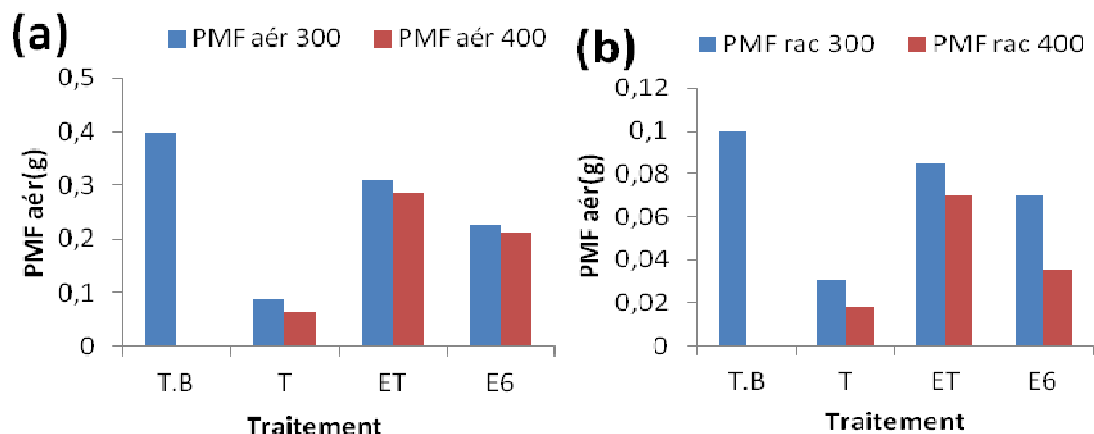


Figure 13: Effet de traitement de sol contaminé par 300 et 400 mg/L du Cr (VI) par les souches ET et E6 sur le poids de la matière fraîche aérienne (PMF aé) (a) et racinaire (PMF rac) (b) du trèfle.

Au bout de 7 jours, les résultats montrent que la croissance des plante dans un sol contaminé par le Cr (VI) (T), est inhibé de 75% pour le poids de la matière fraîche aérienne et de 70% pour le poids de la matière fraîche racinaire en comparaison avec la plante dans le sol non contaminé (T.B). En effet, les métaux non essentiels à la croissance des végétaux, en excès, provoquent aussi bien des chloroses et nécroses que des retards de croissance (inhibition de la croissance) (Williams *et al.*2000). Chez l'orge, la synthèse de polyamines dont la putrescine, principalement due à une exposition au Cr(VI), réduit la croissance, induit la synthèse de

Résultats et discussion

chitinase (facteur de stress) dans les feuilles, et diminue la croissance foliaire et la teneur en eau des feuilles (Banks *et al.* 2006). Au niveau cellulaire, la toxicité peut se traduire par une fixation des métaux aux groupements thiols inhibant ainsi les activités enzymatiques, les synthèses protéiques ou provoquant une carence d'ions essentiels par compétition (Assche et Clijsters 1990).

L'inoculation du sol par les souches ET et E6 a permis de remédier à cette toxicité, et nous avons noté une augmentation du poids de la partie aérienne de 345% pour la souche ET dans un sol contaminé par 300mg/L du Cr(VI), et de 250% pour la souche E6, alors que pour la concentration de 400 mg/L, le poids a augmenté de 454 et 338% respectivement pour les souches ET et E6, en comparaison avec le témoin non traité (T) (figure 13 (a)).

Pour la partie racinaire du trèfle dans un sol contaminé par 400 mg/L, le poids a augmenté de 280 et 233% respectivement pour les souches ET et E6, tandis que dans un sol contaminé par 300 mg/L, le poids a augmenté de 388% pour la souche ET et de 194% pour la souche E6, en comparaison avec le témoin non traité (T) (figure 13 (b)).

Des résultats comparables ont été obtenus pour le tournesol et l'haricot (non montré).

D'après les résultats, on constate que les souches ont permis une amélioration significative de la croissance par rapport au témoin non traité (T), de tel sorte que les plant ont montré une croissance comparable à celle dans un sol non contaminé (TB).

1.2. Cr(VI) soluble dans le sol

L'objectif de cette expérience est de montrer l'efficacité de la réduction du Cr(VI) par les souches ET et E6, pour cela nous avons mesuré le la quantité du Cr(VI) après l'enlèvement des plantes des boites. Les résultats obtenus sont présentés au dessus par (Tableau 3) :

Tableau 3 : Cr (VI) soluble dans le sol des boites de trèfle et de tournesol, contaminées par 300 mg/L du Cr (VI).

	T	E6	ET
Sol-Trèfle	74,44	1,2	4,84
Sol-Tournesol	55	1,12	0,59

Effectivement, on note une diminution importante du Cr(VI) soluble dans les sols traités par les souches E5 et ET.

Ceci confirme les résultats obtenus précédemment, expliquant la croissance importante des plantes cultivées sur sol traité par rapport aux plantes témoins. Toutefois, il faudrait prendre

Résultats et discussion

en considération que les plantes peuvent aussi contribuer à la réduction du Cr(VI) par des mécanismes et processus différents. La plante est capable de mobiliser ou d'immobiliser les métaux en changeant les conditions rhizosphériques par la production d'exsudats racinaires, par extrusion de protons, de phytosidérophores ou d'acides organiques (Wenzel *et al.* 2009) ou en agissant sur la microflore rhizosphérique.

2. Microcosme en pots (sous serre)

Les résultats obtenus précédemment, étaient élaborés dans des conditions axéniques, en boîtes de Petri. Nous avons alors entrepris les mêmes manipulations qu'auparavant mais dans un sol non stérile et en cultivant les plantes sous serre afin d'étudier le comportement de nos souches dans des conditions environnementales.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 15.

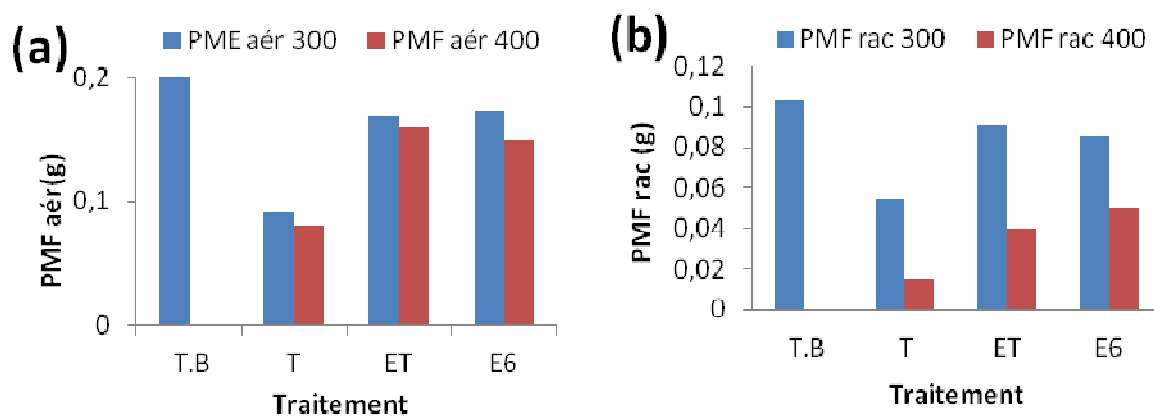


Figure 14 : Effet de traitement de sol contaminé par 300 et 400 mg/L du Cr (VI) par les souches ET et E6 sur le poids de la matière fraîche aérienne (PMF aér) (a) et racinaire (PMF rac) (b) du trèfle.

D'après ces graphes, les résultats confirment ceux obtenus précédemment, et montrent l'efficacité des souches à diminuer la toxicité du Cr(VI) que ce soit dans des conditions axéniques ou dans les conditions environnementales.

Les résultats obtenus montrent le potentiel d'utilisation de nos souches dans des projets de phytoremédiation assistée de bioaugmentation.

V. Lixiviation de sol

Nous avons réalisé des expériences de lixiviation en batch (méthode simple) et en colonne (proche de la réalité) de sols pollués artificiellement au laboratoire par le Cr(VI) seul ou par le Cr(VI), le Cu et le Zn puis, traités par les souches E6 et ET.

1. Lixiviation en batch

1.1. Par les cellules libres et immobilisées

Afin de déterminer les conditions optimales pour obtenir une réduction maximale du Cr(VI) dans le sol, un test par les cellules immobilisées dans les billes d'alginate et les cellules libres est effectué dans le but de comparer leur efficacité.

Les résultats observés sont présentés dans la figure 15.

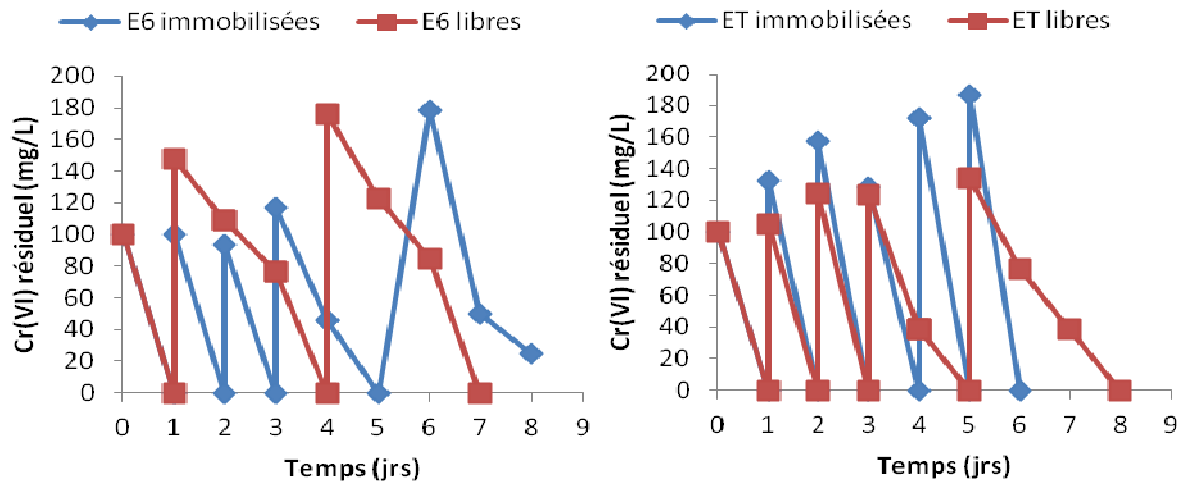


Figure 15: Répétition de la réduction de 100 mg/L du Cr(VI) par les cellules immobilisées en batch par les souches E6 et ET.

Nous avons constaté que la réduction de la première concentration (100 mg/L) par la souche E6 était réalisée avec un ordre cyclique de 24 heures pour les deux premières répétitions, puis il s'est changé en 2 jours pour les cellules immobilisées. Alors que pour les cellules libres, la réduction s'est cadencée avec un ordre cyclique de trois jours après une période de 24 heures. Nous avons constaté aussi que la réduction de la première concentration (100 mg/L) par la souche ET était réalisée avec un ordre cyclique de 24h réguliers pour les cellules immobilisées. Alors que pour les cellules libres, la réduction s'est cadencée avec un ordre cyclique de 24 heures pour les trois premières répétitions, puis ce cycle s'incrémente d'une journée pour les deux répétitions consécutives.

Résultats et discussion

D'après les résultats, on remarque que pour les deux souches E6 et ET, les cellules immobilisées arrivent à diminuer la concentration de Cr(VI) avec une durée plus courte que celle observée par les cellules libres.

Afin de contrôler les paramètres de bioaugmentation des microorganismes dans le sol, la technique d'immobilisations des cellules à été développé. Le but de cette technique d'immobilisation est de limiter les variations des conditions physico-chimiques et biologiques dans l'environnement immédiat des microorganismes, afin de favoriser l'adaptation de ces derniers à leur nouvel environnement, en réduisant le temps de latence, et ainsi d'optimiser la bioaugmentation (Van Elsas et Heijnen, 1990).

1.2. Par les cellules libres en présence du Cr(VI), Cu et du Zn

Les sites pollués sont multi contaminés d'où l'intérêt de cette expérience dans laquelle nous avons suivi l'action des souches dans un sol stérile contaminé par les trois métaux simultanément (Cr, Cu et Zn) à une concentration de 50 mg/L. Les résultats observés sont présentés dans la figure 16.

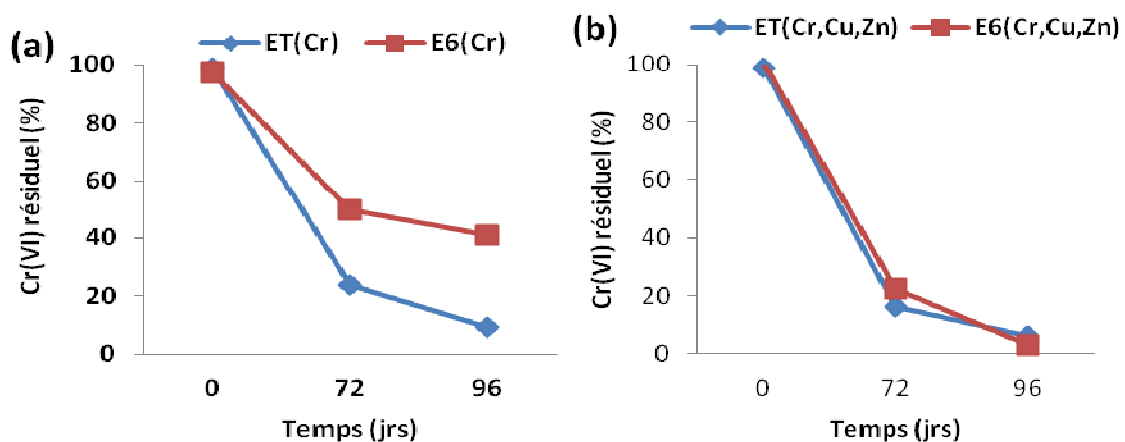


Figure 16: Réduction du Cr (VI) en batch par les souches ET et E6 en absence et en présence de Cu et Zn.

En comparant les résultats entre les deux milieux, on remarque que la présence des métaux (figure 16 (b)) favorise la réduction du Cr(VI) ou nous avons obtenu une réduction de 94% et 98% respectivement pour les souches ET et E6. Alors qu'en absence des métaux nous avons obtenu une réduction de 91% pour ET et 51% pour E6.

Le mécanisme de stimulation de la réduction du Cr(VI) par d'autres métaux n'est pas bien élucidé. La réaction de réduction de Cr(VI) en Cr (III) exige des donneurs d'électrons, cependant, selon Guertin et al. (2005), Mn^{2+} agit comme donneur d'électrons dans cette

Résultats et discussion

réaction. Sikander et Shahid (2007) rapportent que la fonction principale de Cu^{2+} est lié à la protection du transport d'électrons ou d'agir en tant que centre d'oxydo-réduction et d'électrons, dans certains cas, comme une navette pour les électrons entre sous-unités protéiques.

2. En colonne

L'étude du traitement du sol en faisant recours à la technique de lixiviation sur colonne de sol, nous a permis d'évaluer l'effet des souches sur la concentration du Cr(VI) dans les lixiviats de sol en colonne, contaminé par le Cr(VI) seul ou le Cr(VI), le Cu et le Zn (figure 17).

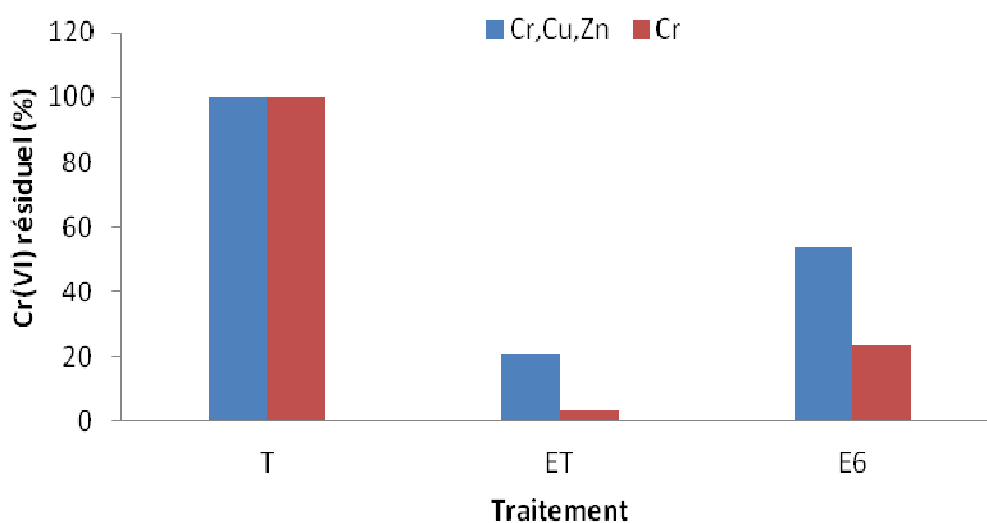


Figure 17: Réduction du Cr (VI) sur colonne par les souches ET et E6 en absence et en présence de Cu et Zn.

On remarque que la souche ET a permis une réduction de 98% en présence de Cr(VI), alors qu'en présence de Cu et Zn la réduction observée est seulement de 80%. Pour la souche E6, la réduction du Cr (VI) en absence des métaux est de 80%, et en présence des métaux est de 57%. Dans le cas de lixiviation en colonne, on a constaté que le rendement en absence des métaux est plus important que si ces métaux sont présents.

En comparant, les résultats de la lixiviation sur colonnes de sol avec la lixiviation en batch, nous notons des différences qui seraient dues à l'effet du temps : 7 jours pour les colonnes contre 48 heures pour le batch. Ce qui aurait une conséquence sur la mobilisation et l'immobilisation des métaux qui selon Crosnier (1999), est un processus à deux phases selon une exposition à long terme ou à court terme.

La réduction du Cr(VI) dans les lixiviats de sols, serait due à une transformation du chrome hexavalent en chrome trivalent sous forme de $\text{Cr}(\text{OH})_3$. C'est un mécanisme potentiel de détoxification, et de contrôle de la dispersion du Cr (Desjardin et al., 2002). La réduction de la

Résultats et discussion

concentration du Cr(VI) obtenu dans ce travail pourrait être due aussi à une adsorption du métal au niveau des cellules et/ou à une immobilisation du polluant au niveau des particules du sol (Braud, 2007).

Ces résultats montrent le potentiel de réduction par nos souches du Cr(VI) dans les lixiviats de sol ce qui contribuerait à grande échelle, à la réduction de la pollution au niveau de la nappe phréatique.

3. Traitement des effluents

3.1. Evolution des paramètres de pollution

Les résultats du suivi de la cinétique d'évolution du Cr(VI), de l'oxydabilité au permanganate de potassium, des orthophosphates et des sulfates dans l'effluent prélevé au niveau de oued Fès et enrichis en Cr(VI), sont représentés sur la figure 18.

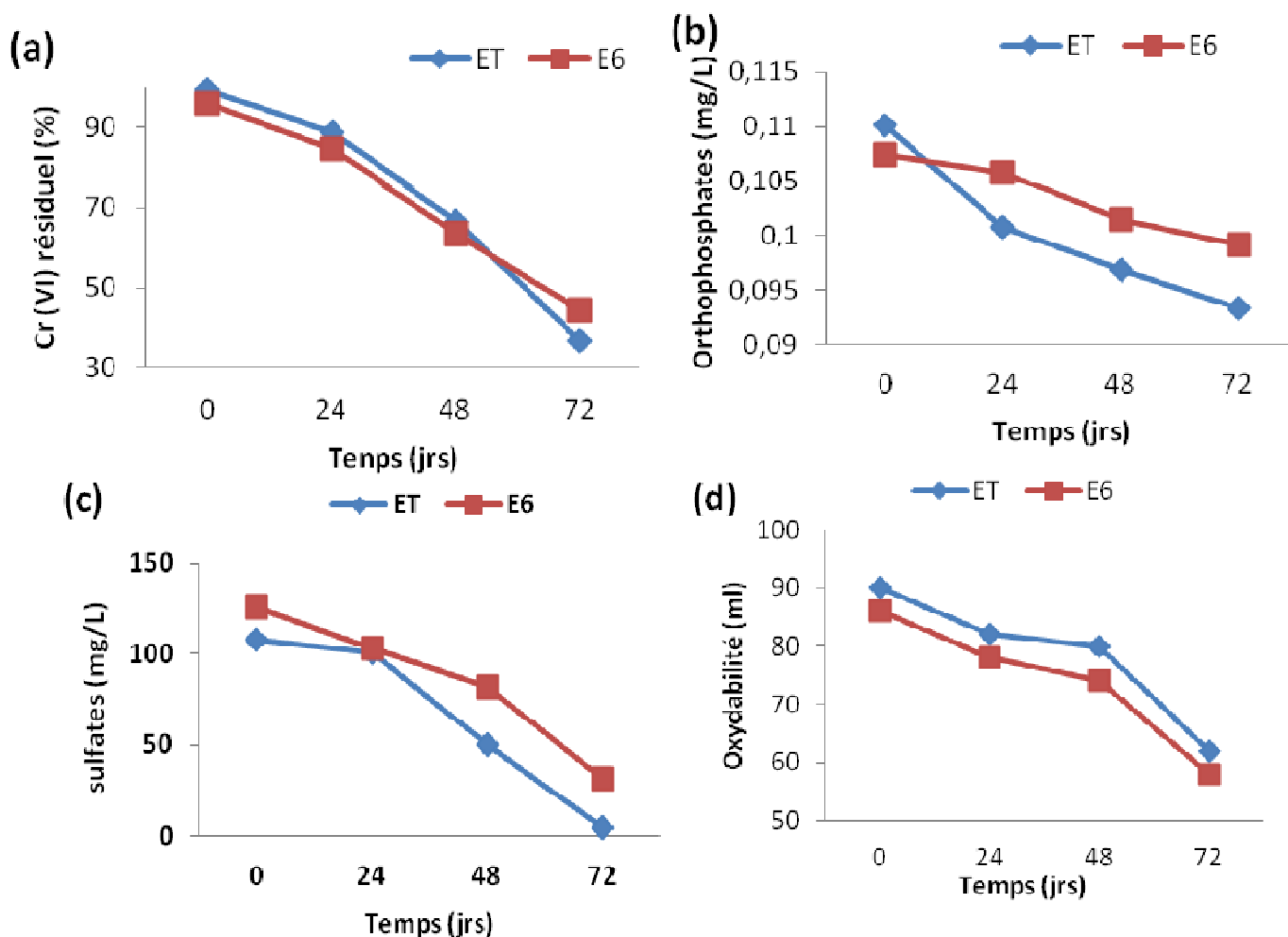


Figure 18: Cinétique d'évolution de la réduction du Cr (VI)(a), d'orthophosphates(b),de sulfates(c) et d'oxydabilité(d) dans l'effluent réel traité par les souches ET et E6.

➤ Cr(VI)

L'évolution du Cr(VI) dans l'effluent réel est démontrée dans la figure 18(a). L'élimination de ce métal par les deux souches étudiées, atteint 68,4 et 66,59%, respectivement pour les souches ET et E6.

Nous avons remarqué d'après les résultats, que les deux souches ET et E6 présentent des pourcentage de réduction très proche.

➤ Orthophosphates

L'évolution des orthophosphates de l'effluent réel traité par les souches ET et E6 est présentée dans la figure 18 (b).

Après 72 h, la diminution des orthophosphates atteint 15,82%, pour la souche ET et 7,77% pour E6 (Figure 18 (b)).

D'après les résultats l'élimination des orthophosphates par la souche ET est le double de celle obtenue par la souche E6 dans l'effluent. Dans un travail similaire sur l'élimination des orthophosphates par *Azolla filiculoides* ont montré qu'elle n'a pu avoir un abattement total des orthophosphates qu'au bout de 10 jours Beqqal (2000). Toutefois, Il est difficile de faire une comparaison en terme de performance, étant donné qu'il ne s'agit pas des mêmes organismes ni des mêmes caractéristiques des effluents.

L'élimination des orthophosphates par nos souches peut être expliquée principalement par l'assimilation par les micro-organismes en l'utilisant comme source de phosphore pour assurer la croissance cellulaire.

➤ Sulfates

La concentration des sulfates diminue de 93,4% et 73,4% au bout de 72h respectivement pour les souches ET et E6 (Figure 18 (c)).

Les résultats montrent que l'élimination des sulfates reste importante par rapport aux autres paramètres de pollution. Des études similaires par Rajesh et al (2010) ont obtenu une valeur de 82,5% comme valeur maximum d'élimination des sulfates par une bactérie sulfato-réductrice en condition anaérobie où le sulfate joue le rôle d'accepteur d'électrons.

Dans notre cas, l'élimination des sulfates peut être expliquée par la réduction anabolique des sulfates en sulfures qui vont être incorporés dans la biomasse cellulaire au cours des réactions de biosynthèse pour assurer la croissance des microorganismes.

➤ Oxydabilité

L'évolution de l'oxydabilité dans l'effluent réel est démontrée dans la figure 18(d). pour les souches

Nous avons noté une réduction de l'oxydabilité de 20,8 et 29,10% respectivement par les souches ET et E6 après 72h de traitement.

3.2 Effet de l'effluent traité sur la croissance des plantes

Dans le but d'étudier l'effet du traitement par les souches ET et E6 sur la toxicité des effluents, le trèfle, est cultivée et arrosé par des effluents traités ou non traités. Le test permet de compléter les paramètres analytiques et témoigne de l'impact biologique global de l'effluent.

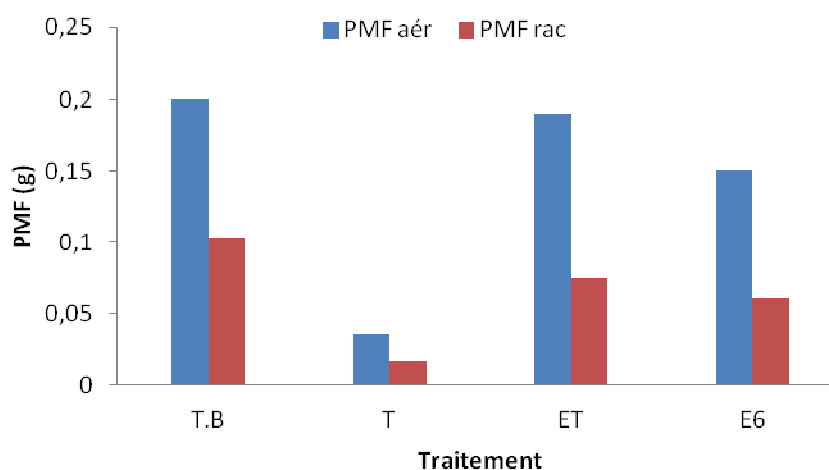


Figure 19 : Effet de l'effluent traité par les souches ET et E6 et non traité (T) sur la longueur (a) et le poids (b) de la partie aérienne et racinaire du trèfle.

Au bout de 20 jours, le poids de la partie aérienne a augmenté de 540 et 420% respectivement pour la souche ET et E6 (figure 19). Alors que pour la partie racinaire le poids a augmenté de 440 et 350,9% respectivement pour les souches ET et E6 (figure 19).

Les résultats montrent que l'effluent réel (enrichi en chrome) non traité a une toxicité vis-à-vis de trèfle en entraînant une réduction dans la croissance et le poids des racines de ces. Cette toxicité serait due aux composés de l'effluent mais surtout à la présence du Cr(VI). En effet, plusieurs travaux ont montré l'effet délétère du Cr(VI) sur la croissance des plantes (Hsu et Chou, 1992; Rout et al. 2000). Le traitement des effluents par les souches microbiennes a permis de diminuer la toxicité de l'effluent vis-à-vis de trèfle et de stimuler les paramètres de croissance. Ces résultats seraient dus à la diminution de la concentration des différents

Résultats et discussion

polluants et surtout à la réduction du Cr(VI) par les souches utilisées comme nous l'avons montré précédemment.

Des résultats similaires ont été rapportés par Kinnari et al., (2010) qui ont montré une stimulation de la germination des graines de vigne par un effluent industriel traité par une souche réductrice du Cr(VI) *Vogococcus* sp., en comparaison avec l'effluent non traité.

Conclusion

Conclusion

Le présent travail représente la continuation d'un projet de recherche du laboratoire de biotechnologie microbienne sur la bioremédiation du chrome dans le sol et les effluents pollués. Après l'isolement des souches bactériennes E6 et ET, capables de réduire le chrome hexavalent (Tahri et al, 2011), il était nécessaire d'approfondir nos connaissances à propos du fonctionnement de ces souches à travers l'étude de la résistance bactérienne aux métaux lourds et la mise en évidence de la capacité des bactéries isolées à détoxifier le Cr(VI) sous différentes conditions environnementales et leur application pour le traitement de sols et d'effluents contaminés par les métaux lourds.

Dans ce sens, nous avons montré la multirésistance de nos souches, qui en plus du Cr(VI), sont capables de résister aux Cr(III), Cu(II), Zn(II), Ni(II), Mn(II) et Co(II) avec des degrés de tolérance variables selon la souche et le métal.

Les bactéries ont montré une réduction ainsi qu'une croissance optimale à des pH neutres à alcalins avec des températures allant de 30 à 35°C, en présence de glycérol pour la souche E6 et de fructose pour la souche ET comme donneurs d'électrons. D'autre part, nous avons constaté que les cellules immobilisées dans des billes d'alginate arrivent à réduire le Cr(VI) de façon plus importante que celle observée par les cellules libres.

L'inoculation de sol contaminé artificiellement par le chrome dans des conditions axéniques et environnementales par les souches ET et E6 a permis de remédier à la toxicité de sol pollué par le Cr(VI), ce qui a permis une amélioration significative de la croissance des plantes traitées (trèfle, tournesol et haricot) par rapport à celle des plantes non traitées, de telle sorte que les plantes ont montré une croissance comparable à celle observée dans un sol non contaminé. Ce résultat a été confirmé par le dosage du Cr(VI) soluble qui a donné une diminution importante.

La lixiviation, en batch et sur colonne, de sol contaminé a montré que la concentration de Cr(VI) dans les lixiviats des sols traités par les souches étudiées est inférieure à celle dans les lixiviats de sols non traités, ce qui contribuerait à réduire la biodisponibilité du Cr(VI) pour les plantes.

Le traitement par ET et E6 d'effluents, prélevés sur oued Fès et enrichis en Cr(VI), a permis de réduire les paramètres de pollution (sulfate, orthophosphates, oxydabilité, Cr(VI)) de ces effluents. L'épuration des effluents est confirmée par un test de toxicité sur des plantes de trèfle dont les résultats ont montré que les souches microbiennes ont permis de diminuer la

Conclusion

toxicité des effluents vis-à-vis des plantes étudiées et de stimuler leur croissance, en comparaison avec des plantes arrosées avec les effluents non traités.

Ainsi, nous avons montré la performance des souches étudiées et leur potentiel d'utilisation pour le traitement des effluents et des sols pour une meilleure gestion des ressources en eau et en sol pour un environnement plus sain et un développement durable.

En perspectives, il serait intéressant de :

- ✓ Optimiser d'autres paramètres de réduction du Cr(VI)
- ✓ Etudier les mécanismes de réduction du Cr(VI)
- ✓ Etudier la capacité de réduction du Cr(VI) en anaérobiose
- ✓ Etudier la capacité de détoxification
- ✓ Etudier l'effet des souches sur la lixiviation/immobilisation des métaux lourds à différents pH et dans différents types de sols.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Alvarez, A.H., R.M. Sanchez, and C. Cervantes., 1999, Chromate Efflux by Means of the ChrA Chromate Resistance Protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 181(23): 7398–7400.
- Amoozegar, M.A., A. Ghasemi, M.R. Razavi, S. Naddaf., 2007, Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, *Nesterenkonia* sp. strain MF2. *Process Biochemistry*. 42 :1475–1479.
- Arun K. Shankera,T, C. Cervantesb, H. Loza-Taverac, S. Avudainayagamd, 2005, Chromium toxicity in plants. *Environment International*. 31, 739– 753.
- Ballatori N., 1994, Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Advances in Pharmacology*, 27: 271–298.
- Banks J., M. Marmot, Z. Oldfield, J.P. Smith, 2006, Disease and Disadvantage in the United States and in England *JAMA*. 295(17):2037-2045.
- Beqqal, 2000, Evaluation des performances d'*Azolla filliculoides* à épurer les eaux usées urbaines a caractaires industrils riches en chrome, cas des tanneries. Thèse de Doctorat. Université mohammed V-agdal. Faculté des sciences. Rabat, Maroc.
- Bisson M., R. Diderich, N. Houeix, C. Hulot, G. Lacroix, j.p. Lefevre, S. Leveque, H. Magaud, A. Pichard, A. Morin, M. Rose, G. Pepin. 2005. Chrome et ses dérivés. p.80.
- Braud A., 2007, Procédé de phytoextraction couplé à la bioaugmentation d'un sol agricole polycontaminé par du chrome, du mercure et du plomb. Thèse de Doctorat. Université Laval, Le-Mans. Canada.
- Campos V. L., R. Moraga, J. Ya'nez, C. A. Zaror, M. A. Mondaca, 2005, Chromate Reduction by *Serratia marcescens* Isolated From Tannery Effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 75:400–406.
- Cervantes, C. et Silver, S, 1992, Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid*.27, 65-71.
- Cervantes C, Garcia JC, Devars S, Corona FG, Tavera HL, Torres-guzman J ,Carlos, 2001, Interactions of chromium with micro-organisms and plants. *FEMS Microbiol Rev*. 25, 47-335.
- Cheung, K.H., and J. D. Gu, 2007, Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59: 8–15.
- Choo T.P., Lee C.K., Low O, 2006, Hishamuddin. Accumulation of chromium (VI) from aqueous solutions using water lilies (*Nymphaea spontanea*). *Chemosphere*. 62, 961–967.

Références bibliographiques

- Crosnier J, 1999, Devenir de la pollution métallique drainée par les eaux fluviales, influence du compartiment microbien et des alternances de dessiccation. Thèse de Doctorat. Université Claude, Lyon, p 282.
- Desjardin, V., (2002), Réduction du chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué. Institut national des sciences appliquées de Lyon. N° d'ordre : 02 ISAL 0030.
- Diederik, J.O., L.A. Piater, and E. van Heerden, 2008, A Novel Chromate Reductase from *Thermus scotoeductus* SA-01 Related to Old Yellow Enzyme. *Journal of bacteriology*. 190 (8) : 3076–3082.
- Dhakephalkar, P. K., Bhide, J. V., et Paknikar, K. M, 1996, Plasmid mediated chromate resistance and reduction in *Pseudomonas mendocina* MCM B-180. *Biotechnology Letters*. 18, 1119-1122.
- Faisal, M., A. Hameed, S. Hasnain, 2005, Chromium-resistant bacteria and cyanobacteria: impact on Cr(VI) reduction potential and plant growth. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 32: 615–621.
- Gadd, G. M. ,1990, Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganism. *Experientia*, 46, 834–840.
- Garnier, J. 2005. Sources et dynamique du chrome dans les sols ultramafiques de niquelandia, brazil. Thèse de Dctorat. Université Paris Sud, Faculté des sciences d'Orsay.
- Guertin, J., Jacobs, J.A. and Avakian, C.P., 2005, Chromium (VI) Handbook (Boca Raton, FL: CRC Press), p. 2.
- Hsu F., Chou C. H, 1992, Inhibitory effect of heavy metals on seeds germination and seedling growth of *Miscanthus* species. *BotBul. Acad. Sch*, 33(4): 335-342.
- Ishibashi, Y., C. Cervantes et S. Silver, 1990, Chromium Reduction in *Pseudomonas putida*. *Applied and environmental microbiology*. 56: 2268-2270.
- Iraklis P., Z. Yin, D. Ladon, D. Baird, A. C. Lewis, A. Sood, R. Newson, Ian D. Learmonth, C. Patrick Case, 2007, Genotoxic effects of particles of surgical cobalt chrome alloy on human cells different age in vitro.
- Kinnari Mistry, Chirayu Desai, Krishna Patel, 2010, Chromate Reduction by *Vogococcus sp.* Isolated from Cr (VI) Contaminated Industrial Effluent. *Electronic Journal of Biology*, Vol. 6(1): 6-12.
- Kramer U. ,2005, Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr Opin Biotechnol*.16, 133–141.

Références bibliographiques

- Krishna, K.R., Philip, L., 2005, Bioremediation of Cr (VI) in contaminated soils. *J. Hazard. Mater. B* 121, 109-117.
- Li, Z., Yu, J.W. et Neretnieks, I., 1996, A new approach to electrokinetic remediation of soils polluted by heavy metals. *Contaminant Hydrology*. 22, 241-253.
- Losi, M. E., C. Amrhein, and J. W. T Frankengerger., 1994, Environmental Biochemistry of Chromium. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 136: 91-121.
- Lydiate, D. J., Mendez, C., Kieser, H.M., et Hopwood, D.A., 1988, Mutation and cloning of clustered *Streptomyces* genes essential for sulphate metabolism. *Mol Gen Genet*. 211, 415-423.
- Marta A. Polti, Maria J. Amoroso, Carlos M. Abate., 2007, Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. *Chemosphere*.67, 660–667.
- MClean, J. AND T. J. Beveridge, 2001, Chromate Reduction by a Pseudomonad Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate. *Applied and environmental microbiology*. 67(3): 1076–1084.
- Mench, M., Vangronsveld, J., Clijsters, H., Lepp, N.W., Edwards, R., 2000, *In situ* metal immobilisation and phytostabilization of contaminated soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. 323-358.
- Middleton S., Rizlan Bencheikh Latmani, Mason R. Mackey, Mark H. Ellisman,3 Bradley M. Tebo, Craig S. Criddle. Cometabolism of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* MR-1 Produces Cell-Associated Reduced Chromium and Inhibits Growth. 23 June 2003 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.10725.
- Mulligan, C. N., Yong, R.N., and B.F Gibbs, 2001, An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments. *Journal of Hazardous Materials*. 85, 145-163.
- Ohta N., R. Peter. Galsworthy, B. Pardee., 1971, Genetics of sulfate transport by *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 105, 1053-1062.
- Opperman, D. J., Piater, L. A. and Van Heerden, E. 2008, A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. *J. Bacteriol*. **190**,3076-3082.
- Nriagu, J.O., et E. Nieboer, 1988, Chromium in the Natural and Human Environments. Wiley-Interscience. 20 : 571 pages.
- Pamukcu,S., 1992, Electrokinetic removal of selected heavy metals from soil. *Environmental Progress*. 13, 241-250.
- Peuke A.D, Rennenberg H. ,2005, Phytoremediation. *EMBO*. 6, 497–501.

Références bibliographiques

- Philip L, Iyengar L, Venkobachar C. 1998. Cr(VI) reduction by *Bacillus coagulans* isolated from contaminated soils. *J Environ Eng* .124, 1165–70.
- Poopal, A.C., R. S. Laxman, 2008, Studies on biological reduction of chromate by *Streptomyces griseus*. *Journal of Hazardous Materials*. 7 pages.
- Potgieter S.S., N. Panichev, J.H Potgieter, S. Panicheva, 2003, Determination of hexavalent chromium in South African cements and cement-related materials with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Cement and Concrete Research*, 33, 1589-1593.
- Rajesh R. K., Manjunatha H.B. and H.S. Aparna, 2010, Altered protease activity due to heat shock in the whole organism *Bombyx mori* L. *African Journal of Biochemistry Research* Vol. 5(7), pp. 206-213.
- Romanenko, V. I. and Koren'kov, V. W, 1977, A pure culture of bacteria utilizing chromates and bichromates as hydrogen acceptors in growth under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya*. 46, 414-417.
- Ross, D.S., R. E. Sjogren, and Bartlett, 1981, Behavior of chromium in soils: IV. Toxicity to microorganisms, *J. Environ. Qual.* 10(2):145-148.
- Rout G. R., Samantary S., Das P., 2000, Effect of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non-tolerant population of *Echinochloa colona*, (L) Link. *Chemosphere*, 40: 855-859.
- Rodier, J. 1984 - L'analyse de l'eau. 7^{ème} édition, Dunod, Paris, 1135pp.
- Sayel H., W. Bahafid, N. Tahri Joutey, K. Derraz, K. Fikri Benbrahim, S. Ibsouda Koraichi, N. El Ghachtouli, 2011, Cr(VI) reduction by *Enterococcus gallinarum* isolated from tannery waste-contaminated soil, *Ann Microbiol* DOI 10.1007/s13213-011-0372-9.
- Shakoori, A.R., M. Makhdoom and R.U. Haq, 2000, Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 53: 348-351.
- Shanker A.K., Djanaguiraman M., Sudhagar R., Chandrashekar C.N., 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. cv CO 4) roots. *Plant Science* 166: 1035-1043.
- Shashidhar.T, S. Murty Bhallamudi, Ligy Philip., 2006, Development and validation of a model of bio-barriers for remediation of Cr (VI) contaminated aquifers using laboratory column experiments. *Journal of Hazardous Materials*. 46, 324-341.
- Shilpi Mitta, Jean-Marie Meyer and Reeta Goel, 2003, Isolation and characterization of aluminium and copper resistant 'P' solubilizing Alkalophilic Bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, pp 583-586.

Références bibliographiques

- Sikander, S. and Shahid, H., 2007, Reduction of toxic hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* strain SDCr-5 stimulated by heavy metals. *Bioresource Technology*, 98, 340–344.
- Sisti, F., P. Allegretti and E. Donati, 1996, Reduction of dichromate by *Thzobaczllus ferrooxidan*. *Biotechnology letters*. 18(12): 1477-1480.
- Smith, F. W., Hawkesford, M. J., Prosser, I. M., et Clarkson, D. T, 1995, Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Mol. Gen. Genet.* 247, 709-715.
- Sultan S., S. Hasnain, 2005, Chromate Reduction Capability of a Gram Positive Bacterium Isolated from Effluent of Dying Industry.
- Tahri Joutey, N., 2009, Bioremédiation du chrome : étude de la reduction du Cr(VI) par des bactéries isolées de biotopes cotaminés par les rejets des tanneries. Master de Biotechnologie Microbienne, FST, Fès.
- Tahri Joutey, N. W. Bahafid, H. Sayel, S. El abed, N. EL Ghachtouli, 2011, Remediation of hexavalent chromium by consortia of indigenous bacteria from tannery waste-contaminated biotopes in Fez, Morocco. *International journal of environmental studies*. DOI:10.1080/00207233.2011.623855.
- Thacker U, Parikh R, Shouche Y, Madamwar D., 2007, Reduction of chromate by cell-free extract of *Brucella* sp. isolated from Cr(VI) contaminated sites. *Bioresour Technol* 98:1541–1547.
- Thiruneelakantan, S., S. Khare, and P.W. Ramteke, 2001, Isolation of hexavalent chromium-reducing Cr-tolerant facultative anaerobes from tannery effluent. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47: 307–312.
- Urvashi T , Rasesh P, Yogesh Shouche B, Datta M , 2006, Reduction of chromate by cell-free extract of *Brucella* sp. isolated from Cr(VI) contaminated sites. *Process Biochemistry* 41, 1332–1337.
- Urvashi Thacker, Rasesh Parikh, Yogesh Shouche , Datta Madamwar, 2007, Reduction of chromate by cell-free extract of *Brucella* sp. Isolated from Cr (VI) contaminated sites. *Bioresource Technology* .98, 1541–1547.
- Van Elsas J.D., Heijnen C.E., 1990, Methods for the introduction of bacteria into soil: A review. *Biology and Fertility of Soils* 10: 127-133.
- Vieweg F., S. Verlagsgesellschaft, H. Brunswick, 1995, Manuel sur l'environnement Volume III: Catalogue des normes antipollution 663 pages.
- Viti C, Pace A, Giovannetti L., 2003, Characterization of Cr(VI) resistant bacteria isolated from chromium contaminated soil by tannery activity. *Curr Microbiol* 46:1–5.

Références bibliographiques

- Wang YT, Shen H., 1995, Bacterial reduction of hexavalent chromium. *J Ind Microbiol.* 14(2):159-63.
- Wang, P.C., T. Mori, K. Toda, and H. Ohtake. 1990. Membrane-Associated Chromate Reductase Activity from *Enterobacter cloacae*. *Journal of bacteriology.* 172(3): 1670-1672
- Wang Y.T., C.S. Xiao, 1995, Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria, *Water Res.* 29 (11) (1995) 2467–2474.
- Wenzel, W.W., 2009, Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil*, 385-408.
- Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L., 2000, Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica Biophysica Acta* 1465: 104-126.
- Woo Chul Bae, Tae Gu Kang, In Kyong Kang, You Jung Won¹, and Byeong Chul Jeong, 2000, Reduction of Hexavalent Chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456 in Batch and Continuous Cultures. *The Journal of Microbiology.* 36-39 Vol. 38, No. 1.
- Yijun Li, Hanbin Xue., 2001, Determination of Cr (III) and Cr(VI) species in natural waters by catalytic cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta.* 448, 121–134.
- Yilmaz EI., 2003, Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Res Microbiol.* Jul-Aug;154(6):409-15.
- Zachara, J.M., D.C. Girvin, R.L. Schmidt, and C.T. Resch, 1987, Chromate adsorption on amorphous iron oxyhydroxide in the presence of major groundwater ions, *Environmental Science and Technology.* 21:589-594.
- Zahoor A, Rehman A., 2009, Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *J Environ Sci* 21:814–820.
- Zhiguo H, Fengling G, Tao S, Yuehua H, Chao H (2009) Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction *Ochrobactrum* sp. Strain CSCr-3 from chromium landfill. *J Hazard Mater* 163:869–873.
- Zhitkovitch A, Costa M., 1992, A simple sensitivity assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo. *Carcinogenesis*, 13:1485–1489.

Annexes

Annexes

- Le milieu Luria Bertoni (LB) liquide, de composition dans 1l d'eau distillée :
 - ✓ Peptone 10g
 - ✓ NaCl 10g
 - ✓ Extrait de levure 5g
 - ✓ Le pH est ajusté avec une solution de NaOH ou HCl.

- Le milieu minéral synthétique utilisé est couramment appelé au laboratoire M63 (Desjardin, 2002).

Sa composition est la suivante : KH_2PO_4 0.1 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mM, FeSO_4 3.2 μM , MgSO_4 1.6 mM, thiamine 0.0001 % ; pH ajusté à 6.8 avec KOH 6 M.

Préparé de la manière suivante pour 1 litre :

- ✓ KH_2PO_4 13,6 g ;
- ✓ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (solution à 20%) 10,0 mL ;
- ✓ $\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ (solution à 20%) 1,0 mL ;
- ✓ $\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ (solution à 0,1%) 1,0 mL ;
- ✓ KOH (solution à 130 g.L⁻¹) 8,3 mL ;
- ✓ Thiamine (solution à 0.05 %) 1,0 mL
- ✓ Une source de carbone est ajoutée, le glucose (noté G) à une concentration finale de 10 g/L.