

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE  
HOUARI BOUMEDIENE**

**FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES**



**MEMOIRE**

**Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER**

**En : SCIENCES DE LA NATURE**

**Spécialité : Ecologie Microbienne de la Rhizosphère**

**Par : M<sup>me</sup> Insaf TOU-DALLIL**

**Sujet**

**Bioremédiation du Cd, Zn et Cu, par deux bactéries  
rhizosphériques**

**Soutenu publiquement le 16/06/2013, devant le jury composé de :**

M<sup>me</sup> F.Rahmania

M<sup>r</sup> Y.Kaci

M<sup>me</sup> S.Athmania-Guemouri

M<sup>me</sup> M.A.Aziza

Professeur.USTHB

Professeur.USTHB

Maitre de conférence A-USTHB

Directrice de recherche-CDER

**Présidente**

**Directeur de mémoire**

**Examineur**

**Examineur**

## Résumé

La résistance des deux bactéries rhizosphériques : *Burkholderia fungorum* et *Pseudomonas putida*, au Cd, Zn et Cu, a été étudiée en utilisant la méthode des puits par diffusion du métal en milieu SLP solide et observation des zones d'inhibition. Les deux souches ont montré des Concentrations Minimales Inhibitrices élevées dont : (100 mg/L, 400 mg/L, 300 mg/L) chez *P. putida* souche Pp01 et (100 mg/L, 1000mg/L, 500 mg/L) chez *B. fungorum* souche Bf01 pour le Cu, Cd et Zn respectivement. Le même ordre de toxicité a été noté pour *B. fungorum* et *P. putida*: Cu > Zn > Cd. Il a été donc admis dans ce travail que *B. fungorum* disposait d'une meilleure résistance aux métaux et a été choisie de ce fait pour l'étude de l'élimination des métaux. Les cinétiques de la croissance bactérienne et de la réduction des métaux ont été suivies en milieu SLP liquide, additionné de concentrations croissantes en métaux. Les métaux éliminés par *B. fungorum*, sont analysés par Spectrométrie à Absorption Atomique dans le surnageant après centrifugation 15 mn à 15000 rpm. A la lumière des résultats, *B. fungorum* a exposé une haute affinité pour l'élimination du Cd, Zn et Cu. L'élimination a débuté dès les premières heures du contact de la bactérie avec le métal. La majorité s'est faite pendant la phase exponentielle de croissance, et quand elle a abouti le plateau, elle avait atteint presque les 90% pour les trois métaux. Les deux souches étudiées avaient donc montré un fort degré de résistance aux trois métaux, spécialement le cadmium (un métal très toxique), chez *Burkholderia fungorum*, qui présente un excellent outil biologique de bioremédiation des métaux lourds, pour son efficacité, disponibilité et faible cout.

**Mots clés** : *Burkholderia fungorum*. *Pseudomonas putida*, bioremediation, cadmium, cuivre, zinc, métaux lourds

*«Les êtres vivants ne peuvent construire et maintenir leur existence, leur autonomie, leur individualité, leur originalité que dans la relation écologique, c'est à dire dans et par la dépendance à l'égard de leur environnement ; d'où l'idée alpha de toute pensée écologisée : l'indépendance d'un être vivant nécessite sa dépendance à l'égard de son environnement ».*

Edgar Morin (La Méthode, tome I).

## ***Remerciements***

Ce mémoire n'aurait pas vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mon encadreur, le professeur ***YAHIA KACI*** que je remercie vivement. La pleine confiance qu'il m'a accordé dès l'acceptation de la direction de ce travail, m'a permis d'aimer et mener à bien ma mission. Je le remercie aussi pour le temps et la patience qu'il m'a consacrés, d'avoir cru en mes capacités et d'avoir sans cesse stimulé ma volonté. En effet, son indéfectible soutien moral m'a permis de résister aux difficultés de tout ordre. Les conseils qu'il m'a prodigués, tout au long de ma recherche, ont toujours été clairs et précis, et m'ont facilité grandement les tâches de conception et de mise à l'épreuve par la manipulation en laboratoire. Sa présence quasi permanente, n'a pas cessé d'interpeller ma conscience et m'inspirera à jamais un sentiment de fierté à l'égard de l'encadrement universitaire de mon pays.

Je remercie le professeur ***N.Yassaa***, directeur du CDER pour les moyens qu'il a mis à ma disposition.

Je tiens à remercier du fond de mon cœur toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce travail et tous ceux qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse.

Je remercie madame ***F.Rahmania*** pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail en acceptant d'examiner ce mémoire et de présider mon jury de soutenance

Ma respectueuse reconnaissance à mesdames ***S.Guemmouri*** et ***M.A.Aziza*** pour avoir eu la gentillesse d'examiner mon travail en siégeant dans le jury de soutenance.

Je tiens également à remercier madame ***Malika Djebara*** pour m'avoir fourni l'outil fondamental nécessaire à mon travail et pour m'avoir conseillé.

Il m'est agréable d'associer à mes remerciements mon ancien directeur du CDER, Monsieur ***M. Belhamel*** pour m'avoir facilité le travail au sein du laboratoire de ma division Bioénergie et Environnement, pour m'avoir vivement encouragé et pour les moyens qu'il a mis à ma disposition pour le bon déroulement de ce travail.

De vifs remerciements vont à mes collègues et amies ***Souad Chergui*** et ***Hassiba Zemmouri*** pour m'avoir si précieusement guidé et pour m'avoir aidé et conseillé pour la préparation et l'analyse des solutions.

Je remercie mon collègue **Benamar Cheknane** pour ses remarques pertinentes et son aide dans le domaine de la bioremédiation des métaux lourds en particulier et leur adsorption en générale.

Ma collègue et mon amie **Rahma**, je ne te remercierai jamais assez pour toute l'aide précieuse que tu m'as procuré, pour ta disponibilité et surtout pour ton soutien moral qui m'a beaucoup aidé à tenir jusqu'à ce jour.

Je remercie mes collègues **Djaafar et Samy**, d'être présents à chaque fois j'ai besoin de leur aide.

Je remercie tout le personnel de la division **BioEnergie et Environnement** pour m'avoir encouragé et soutenu pendant tout mon travail, et surtout pour les moments de joie que j'ai partagé avec eux.

Je tiens également à remercier **Mr Elhaouasse** de la direction de l'environnement qui m'a aidé lors de l'analyse des métaux lourds.

Merci plus particulièrement à mon époux « **Hamid** » pour la documentation et le matériels qu'il m'a procuré, pour sa disponibilité et sa compréhension, pour m'avoir soutenu et assisté durant toute cette période. Tu es la personne qui compte le plus pour moi, qui a su me faire aller de l'avant et me donner toute la motivation nécessaire pour finir. Merci **Hamid**

Pour mes parents, un simple merci ne suffit pas, je tiens à vous transmettre toute ma reconnaissance et ma gratitude pour ce que je suis aujourd'hui et je tiens à vous demander pardon pour mon absence et mon indisponibilité toute cette dernière période. **Mon papa** je ne te remercierai jamais assez, c'est grâce à ta forte ambition que moi j'ai pu travailler et je ne cesserai jamais de le faire inchaallah, je sais que ma réussite dans les études fait ton bonheur, et que nous somme ton bonheur. Je t'aime très fort. **Mama**, je te dis merci et mille merci pour ton soutien, ta compréhension et ton inquiétude.

Un grand merci à ma famille qui a su me soutenir durant mon travail mais surtout qui a essuyé les mauvais moments sans parfois vraiment comprendre. Je suis désolé pour ça. Mais heureusement que vous étiez là, mes frères et sœurs : **Ikram, Rachad, Ihsane, Hidaya**, et **Bilal**, je vous aime très fort.

Pour mes enfants : **Rawnak, Abdeljalil** et **Youcef**, merci tout simplement d'être dans ma vie.

Je tiens à saluer à ma belle famille, spécialement ma **belle mère** qui attendait ce jour avec impatience.

Un grand merci à ma cousine **Houda**, pour m'avoir beaucoup aidé et soutenu moralement dans les moments les plus difficiles et ce jusqu'à la fin de ce travail.

*Mes derniers remerciements et non les moindres vont à toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu de près ou de loin, et que j'ai peut être oublié par mégarde.*

## Table des matières

Liste des Abréviations

Liste des figures et tableaux

Glossaire

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>Objectif général</b>	<b>2</b>
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b>	<b>3</b>
<b>Partie A : Généralité sur les métaux lourds</b>	<b>4</b>
<b>I. Qu'est ce que les métaux lourds?</b>	<b>4</b>
<b>II. Sources des métaux lourds</b>	<b>5</b>
<b>III. Données toxicologiques sur les métaux lourds</b>	<b>6</b>
<b>III.1. Le Cadmium</b>	<b>6</b>
<i>III.1.1 généralités sur le Cadmium (Cd)</i>	<b>6</b>
<i>III.1.2 Le cadmium dans l'environnement</i>	<b>7</b>
<i>III.1.3 La toxicité du cadmium</i>	<b>8</b>
<b>III.2. Le zinc</b>	<b>8</b>
<i>III.2.1. Généralités sur le zinc(Zn)</i>	<b>8</b>
<i>III.2.2. Le zinc dans l'environnement</i>	<b>9</b>
<i>III.2.3. Le zinc et la santé : Un oligo-élément indispensable à faible dose</i>	<b>9</b>
<i>III.2.4. Le zinc : un polluant à forte dose</i>	<b>9</b>
<b>III.3. Le cuivre</b>	<b>10</b>
<i>III.3.1. Généralités sur le cuivre (Cu)</i>	<b>10</b>
<i>III.3.2. Le cuivre dans l'environnement</i>	<b>10</b>
<i>III.3.3. Effet du cuivre sur la santé</i>	<b>11</b>
<b>Partie B : La résorption des métaux lourds</b>	<b>12</b>

<b>I.</b>	<b>Procédés d'éliminations des métaux lourds</b>	<b>12</b>
<b>I.1.</b>	<b>Les procédés chimiques</b>	<b>12</b>
<b>I.2.</b>	<b>Les procédés biologiques</b>	<b>13</b>
	- <i>La phytoremédiation</i>	<b>13</b>
	- <i>La bioremédiation</i>	<b>14</b>
<b>I.3.</b>	<b>La biomasse exploitée dans la bioremédiation des métaux lourds</b>	<b>14</b>
	- <i>L'élimination des métaux par la biomasse fongique</i>	<b>14</b>
	- <i>L'élimination des métaux par la biomasse algale</i>	<b>14</b>
	- <i>L'élimination des métaux par la biomasse bactérienne</i>	<b>14</b>
<b>II.</b>	<b>Les conditions de bioremédiation des métaux lourds</b>	<b>15</b>
<b>II.1.</b>	<b>Le pH</b>	<b>15</b>
<b>II.2.</b>	<b>Le Temps de contact</b>	<b>15</b>
<b>II.3.</b>	<b>La concentration initiale en ions métalliques</b>	<b>15</b>
<b>II.4.</b>	<b>La compétition et sélectivité</b>	<b>16</b>
<b>II.5.</b>	<b>La concentration de la biomasse</b>	<b>16</b>
<b>II.6.</b>	<b>La température</b>	<b>16</b>
<b>III.</b>	<b>Le mécanisme de rétention à travers la cellule</b>	<b>17</b>
<b>III.1.</b>	<b>les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire bactérienne (Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>)</b>	<b>17</b>
	<i>III.1.1. Les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire des Gram positif</i>	<b>18</b>
	<i>III.1.2. Les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire des Gram négatif</i>	<b>18</b>
<b>III.2.</b>	<b>Interactions entre les bactéries et les métaux dans l'environnement</b>	<b>19</b>
	<i>III.2.1. Stratégies de survie des bactéries résistantes</i>	<b>20</b>
	<i>III.2.2. Adsorption et croissance microbienne</i>	<b>21</b>
<b>IV.</b>	<b>La rétention des métaux lourds dans l'environnement</b>	<b>21</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Biofilm et EPS pour la rétention des métaux lourds</b>	<b>22</b>
	<i>IV.1.1. Qu'est ce qu'un biofilm ?</i>	<b>22</b>
	<i>IV.1.2. Les biofilms pour la rétention des métaux lourds</i>	<b>23</b>

IV.1.3. Qu'est ce que les exopolysaccharides ou EPS ?	23
IV.1.4. Rôles et intérêts des EPS pour la rétention des métaux lourds	23
<b>V. Les microorganismes utilisés en bioremédiation</b>	<b>23</b>
<b>Partie C : Les modèles bactériens impliqués</b>	<b>25</b>
<b>I. <i>Pseudomonas putida</i></b>	<b>25</b>
<b>I.1. Caractères bactériologiques</b>	<b>25</b>
<b>I.2. Conditions de culture</b>	<b>25</b>
<b>I.3. Tolérance du cuivre, du cadmium et du zinc chez <i>Pseudomonas putida</i></b>	<b>26</b>
<b>I.4. Classification scientifique <i>Pseudomonas putida</i></b>	<b>26</b>
<b>II. <i>Burkholderia fungorum</i></b>	<b>27</b>
<b>II.1. Caractères bactériologiques</b>	<b>27</b>
<b>II.2. Conditions de culture</b>	<b>27</b>
<b>II.3. <i>Burkholderia sp.</i>, a un pouvoir de bioremédiation et un effet PGPR</b>	<b>28</b>
<b>II.4. Classification scientifique</b>	<b>28</b>
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</b>	<b>29</b>
<b>I. Matériels</b>	<b>30</b>
<b>I.1. Matériels biologiques et collecte des échantillons</b>	<b>30</b>
I.1.1. Les bactéries	30
<b>I.2. Milieux de culture</b>	<b>30</b>
I.2.1. Le milieu SLP ( <i>Sucrose minimal salts Low Phosphates</i> )	30
<b>I.3. Solutions des métaux lourds</b>	<b>31</b>
<b>II. Méthodes</b>	<b>31</b>
<b>II.1. Repiquage des bactéries sur milieu solide (test de viabilité)</b>	<b>31</b>
<b>II.2. Préparation des solutions des métaux lourds</b>	<b>31</b>
<b>II.3. Préparation des suspensions bactériennes de <i>Burkholderia fungorum</i> et <i>Pseudomonas putida</i></b>	<b>32</b>

<b>II.4. Résistance de <i>B.fungorum</i> et <i>P.putida</i> aux Cd, Cu et Zn</b>	<b>32</b>
II.4.1. Protocole d'étude de la résistance par diffusion du métal sur milieu solide	32
II.4.2. Résistance des souches en milieu liquide et cinétique de viabilité	33
- Suivi de la croissance bactérienne de <i>B. fungorum</i> en milieu liquide	33
- Evaluation de la résistance bactérienne de <i>B. fungorum</i> en milieu liquide	34
<b>II.6. Elimination du Cd, Zn et Cu par <i>B. fungorum</i></b>	<b>34</b>
<b>Chapitre 3 : Résultats et discussions</b>	<b>36</b>
<b>I. Test de viabilité de <i>P. putida</i> Pp01 et <i>B. fungorum</i> Bf01 sur milieu SLP solide</b>	<b>37</b>
<b>II. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)</b>	<b>37</b>
<b>II.1. La CMI sur milieu SLP solide</b>	<b>37</b>
II.1.1. <i>Pseudomonas putida</i> souche Pp01	37
➤ Le cuivre	37
➤ Le cadmium	38
➤ Le zinc	38
II.1.2. <i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01	39
➤ Le cuivre	39
➤ Le cadmium	39
➤ Le zinc	40
II.1.3. Conclusion	40
<b>II.2. La CMI de <i>B. fungorum</i> souche Bf01 en milieu SLP liquide</b>	<b>41</b>
➤ Le cuivre	41
➤ Le cadmium	43
➤ Le zinc	44
II.2.1. Conclusion	46
<b>II.3. Comparaison des cinétiques de croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf01 en présence des métaux lourds (Cd, Zn et Cu) aux seuils de tolérance</b>	<b>46</b>
<b>II.4. Elimination du Cd, Zn et Cu</b>	<b>47</b>
➤ Pour le cuivre	47

➤ Pour le cadmium	48
➤ Pour le zinc	49
<b>II.5. Cinétique de biorésorption comparée à la croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf01</b>	<b>50</b>
➤ Pour le cuivre	51
➤ Pour le cadmium	52
➤ Pour le zin	53
<b>II.6. Suivi du pH</b>	<b>54</b>
<b>II.7. Conclusion</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>59</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>61</b>

## Liste des Abréviations

- **$\Delta Cc$**  : Variation de la concentration
- **$\Delta t$**  : Variation de temps
- **As** : Arsenic
- **ATP** : Adénine Tris Phosphate
- **BSR** : Bactéries Sulfato-Réductrices
- **Ca** : Calcium
- **Cc** : Concentration
- **Cd** : Cadmium
- **CMI** : Concentration Minimal Inhibitrice
- **Cr** : Chrome
- **Cu** : Cuivre
- **DO** : Densité optique
- **ETM** : Eléments de Traces Métalliques
- **Fe** : Fer
- **h** : Heure
- **L** : Litre
- **Mg** : Magnésium
- **mg** : Miligramme
- **MIC** : Minimum Inhibitory Concentration
- **Mn** : Manganèse
- **nm** : Nanomètre
- **Pb** : Plomb
- **Psi** : *Pound per square inch* » (« livre par pouce carré », lbf/in<sup>2</sup>), est une unité de mesure de contrainte et de pression anglo-saxonne
- **Qté** : Quantité
- **rpm** : Rotation par minute
- **SAA** : Spectrophotométrie à Absorption Atomique
- **Se** : Sélénium

## *Liste des abréviations*

---

- **tpm** : Tour par minute
- **Zn** : Zinc

## Liste des Figures

- Figure 1.** Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> \_\_\_\_\_ **19**
- Figure 2.** Les différents mécanismes de résistance des bactéries contre les métaux (M) \_\_\_\_\_ **22**
- Figure 3.** Schéma du protocole de détermination de la MIC par diffusion sur milieu solide (méthode des puits) \_\_\_\_\_ **33**
- Figure 4.** Suivi de la croissance de *B. fungorum* souche Bf01 en présence et en absence de métaux \_\_\_\_\_ **34**
- Figure 5.** Morphologie des colonies bactériennes sur milieu SLP solide \_\_\_\_\_ **37**
- Figure 6.** Effet des concentrations croissantes en Cuivre (de 0.05 à 10g/L) sur la croissance de *Pseudomonas putida* souche Pp01 en milieu SLP solide \_\_\_\_\_ **37**
- Figure 7.** Effet de concentrations croissantes en Cadmium (de 0.05 à 10g/L) sur la croissance de *Pseudomonas putida* souche Pp01 en milieu SLP solide \_\_\_\_\_ **38**
- Figure 8.** Effet de concentrations croissantes en Zinc (de 0.05 à 10g/L) sur la croissance de *Pseudomonas putida* souche Pp01 en milieu SLP solide \_\_\_\_\_ **38**
- Figure 9.** Effet de concentrations croissantes en Cuivre (de 0.05 à 10g/L) sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP solide \_\_\_\_\_ **39**
- Figure 10.** Effet de concentrations croissantes en Cadmium (de 0.05 à 10g/L) sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP solide \_\_\_\_\_ **39**
- Figure 11.** Effet de concentrations croissantes en Zinc (de 0.05 à 10g/L) sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP solide \_\_\_\_\_ **40**
- Figure 12.** Effet de différentes concentrations en Cuivre (de 0.02 à 0.2 g/L) sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP liquide \_\_\_\_\_ **41**
- Figure 13.** Effet de différentes concentrations en Cd (de 0.5 à 2.5 g/L) sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP liquide sur 96 heures \_\_\_\_\_ **43**
- Figure 14.** Effet de différentes concentrations en zinc (de 0.3 à 0.6 g/L) sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP liquide \_\_\_\_\_ **44**

<b>Figure 15.</b> Cinétiques de croissance comparées de <i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01 en présence des métaux lourds (Cd, Zn et Cu) aux seuils de tolérance	<b>46</b>
<b>Figure 16.</b> Cinétique d'élimination du Cu dans la solution aqueuse, en présence de la bactérie <i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01	<b>47</b>
<b>Figure 17.</b> Cinétique d'élimination du Cd dans la solution aqueuse, en présence de la bactérie <i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01	<b>48</b>
<b>Figure 18.</b> Cinétique d'élimination du Zn dans la solution aqueuse, en présence de la bactérie <i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01	<b>49</b>
<b>Figure 19.</b> Cinétique de biorésorption du Cu et croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf01	<b>51</b>
<b>Figure 20.</b> Cinétique de biorésorption du Cd et croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf01	<b>52</b>
<b>Figure 21.</b> Cinétique de biorésorption du Zn et croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf01	<b>53</b>
<b>Figure 22.</b> Rendement du processus de bioremédiation	<b>54</b>
<b>Figure 23.</b> Variations du pH en présence et en absence de métaux	<b>55</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I.</b> Sources des métaux lourds	<b>5</b>
<b>Tableau II.</b> Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement	<b>6</b>
<b>Tableau III.</b> Principaux groupements fonctionnels et constituants membranaires chez les bactéries	<b>18</b>
<b>Tableau IV.</b> Codification des concentrations des solutions des métaux lourds	<b>32</b>
<b>Tableau V.</b> Concentrations minimales inhibitrices des deux souches ( <i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01 et <i>Pseudomonas putida</i> souche Pp01) sur milieu solide SLP	<b>40</b>
<b>Tableau VI.</b> Taux de réduction de la croissance de <i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01, en présence de différentes concentrations en cuivre	<b>42</b>
<b>Tableau VII.</b> Taux de réduction de la croissance de <i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01, en présence de différentes concentrations en cadmium	<b>43</b>
<b>Tableau VIII.</b> Taux de réduction de la croissance de <i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01, en présence de différentes concentrations en zinc	<b>45</b>
<b>Tableau IX.</b> Comparaison des taux de réduction et des vitesses d'élimination du Cu au niveau des 2 phases (0-24h et 24-120h)	<b>48</b>
<b>Tableau X.</b> Comparaison des taux de réduction et des vitesses d'élimination du Cd au niveau des 2 phases (0-24h et 24-120h)	<b>49</b>
<b>Tableau XI.</b> Comparaison des taux de réduction et des vitesses d'élimination du Zn au niveau des 2 phases (0-24h et 24-120h)	<b>50</b>

## Glossaire

- **La bioaugmentation** consiste à introduire des cultures de microorganismes dotés d'une grande capacité (une ou plusieurs espèces sélectionnées) à la surface du milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodégradation des contaminants organiques.
- **La biofiltration** est l'utilisation d'un biofiltre pour traiter les émissions gazeuses : Le principe consiste à utiliser des microorganismes pour dégrader les polluants contenus dans l'air à traiter, où l'air à épurer (à dépolluer) traverse d'abord un filtre et un humidificateur afin de supprimer les particules (poussières, graisses) présentes dans le gaz et d'amener le niveau d'humidité à 100%. L'air est ensuite introduit dans un réacteur (une cuve) contenant un garnissage formé de matériaux très poreux (très avide pour l'humidité). A la surface des particules qui constituent le garnissage se trouve un biofilm qui correspond à une pellicule d'eau contenant des microorganismes (bactéries et champignons) dont la fonction est de dégrader les polluants présents dans l'air à traiter.
- **La biostimulation** 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).
- **Le compostage** est un procédé biologique contrôlé qui assure la transformation et la valorisation des matières organiques (sous produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique) en un produit stabilisé, hygiénique, semblable à un terreau riche en composés humiques le compost réutilisable en agriculture ou dans le jardin pour fertiliser la terre. C'est la fermentation des ordures ménagères organiques (résidus alimentaires) et des déchets verts (feuillages, résidus de jardinage)
- **La biolixiviation** 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 l'absence d'oxygène. Deux facteurs sont importants pour la biolixiviation : la température qui doit être

comprise entre 25 et 35 °C, et a taille des particules qui doivent être très proches de celle des bactéries.

- **Bioweathering** : biolixiviation
- **Bouillie bordelaise** : La bouillie bordelaise est une solution de sulfate de cuivre additionné de chaux. Le produit se présente sous la forme d'une poudre bleue, à diluer pour pulvérisation. Très utilisée en jardinage, c'est un remède très ancien contre les maladies des plantes cultivées (algicide, fongicide). Toutefois à ne pas en abuser, car le produit peut être toxique pour la plante et polluer le sol.
- **Cécité nocturne** est une dégénérescence précoce de la rétine qui conduit à une diminution ou à une perte de la vision de nuit, elle peut aussi conduire à une cécité totale
- **Cémentation** est un traitement thermo-chimique qui consiste à faire pénétrer superficiellement du carbone dans un acier dont le pourcentage de carbone est insuffisant pour prendre de la trempe, afin de le transformer en surface en un acier fortement carburé susceptible d'être trempé
- **Chimiotropisme** est un déplacement d'un organe ou d'une cellule, orienté par un gradient de concentration chimique. En clair l'organe va être attiré (chimiotropisme positif) ou repoussé (chimiotropisme négatif), par une molécule
- **Chimiotactisme bactérien** Le système du chimiotactisme permet à la bactérie de sentir le milieu environnemental et provoque une réponse par un changement de rotation des flagelles. Il permet à la bactérie de fuir un environnement néfaste et s'approcher d'un environnement favorable.
- **Composé xénobiotique** molécule chimique de synthèse étrangère à l'organisme, résistante à la biodégradation et possédant des propriétés toxiques même à faible concentration.
- **Effet PGPR** : **P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria; cela permet à la plante de développer un système racinaire abondant lui permettant notamment de coloniser une plus grande surface du sol, d'où une meilleure alimentation minérale et hydrique.
- **Etat d'oxydation**, en chimie, décrit par le nombre d'oxydation (n.o.) ou le degré d'oxydation (d.o.), caractérise l'état électronique d'une espèce chimique (molécule, ion, radical) par rapport à l'état élémentaire neutre servant de référence (n.o. = 0).

Dans le cas d'ions monoatomiques, il correspond à la valeur de la charge portée par l'ion (exemple : n.o. ( $\text{Na}^+$ ) = +1). En revanche, dans le cas des autres espèces

chimiques, il indique le nombre d'électrons que chaque atome aurait donné ou reçu par rapport à l'état neutre si les liaisons dans lesquelles ces atomes sont impliqués étaient de nature purement ionique (voir Liaison ionique).

Le nombre d'oxydation est une approximation conceptuelle commode lorsque l'on considère les réactions d'oxydo-réduction et les réactions électrochimiques. Il facilite le suivi des électrons et aide à vérifier qu'ils sont bien conservés.

- **Genre ubiquiste ou omniprésent** : L'**ubiquité** ou l'**omniprésence** est la capacité d'être présent en plusieurs lieux simultanément. Le terme est dérivé du latin « *ubique* » qui signifie « partout ». La notion se rencontre aussi bien dans les domaines de l'informatique, de la biologie, de l'écologie, de la géographie, de la sociologie et des mathématiques.
- **Homéostasie** L'homéostasie se définit comme la capacité de l'organisme de maintenir un état de stabilité relative des différentes composantes de son milieu interne et ce, malgré les changements constants de l'environnement externe.
- **Hypogonadisme** est un terme médical désignant un défaut de l'appareil reproducteur résultant en perte de fonction des gonades (ovaires ou testicules).
- **Internalisation cellulaire** Le mécanisme de transport de molécules voire de particules (virales, bactériennes, etc.) vers l'intérieur de la cellule.
- **Léthargie** est une forme de vie ralentie (hibernation, estivation) qui permet à certains animaux (invertébrés et vertébrés) de surmonter des conditions ambiantes défavorables. Les animaux en léthargie ont des fonctions vitales extrêmement réduites (la température du corps baisse, les battements cardiaques et les mouvements respiratoires deviennent moins fréquents). Toutefois, une certaine quantité d'énergie est nécessaire à l'animal pour accomplir ses fonctions vitales, même si elles sont réduites au minimum. Pour cela, avant de tomber en léthargie, il accumule des réserves de graisses et de sucres destinées à être métabolisées au cours de cette période. La léthargie, généralement périodique, correspond aux températures estivales maximales (*estivation*), ou aux températures hivernales minimales (*hibernation*). Il y a aussi des cas de léthargie non périodique, qui se produisent occasionnellement pour surmonter des difficultés ambiantes particulières.

La **léthargie** peut aussi faire référence à un symptôme de fatigue anormale ou d'aversion à l'activité induit par certaines maladies, blessures, médicaments ou drogues

- **Métabolite** Composé stable issu de la transformation biochimique d'une molécule initiale par le métabolisme.
- **Microcapsule** Excipient sous forme de petite sphère dont le diamètre est compris entre quelques microns et un millimètre contenant au sein d'une enveloppe ou capsule solide des substances liquides ou solides.
- **Mucoviscidose** Maladie génétique létale due à la modification de la composition du mucus sécrété principalement par les muqueuses respiratoires et digestives. Elle se manifeste par une gêne respiratoire handicapante (obstruction des bronches), des troubles digestifs (occlusions intestinales) et un déséquilibre nutritionnel.
- **Tannerie** est un atelier où des peaux d'animaux (bœuf, mouton, chèvre, cochon) sont traitées chimiquement et mécaniquement pour la production de cuir.

## INTRODUCTION

L'utilisation industrielle accrue des métaux et des produits chimiques entraîne une augmentation alarmante des concentrations des métaux dans l'environnement, ce qui est devenu l'un des plus graves problèmes environnementaux aujourd'hui. En raison de leur récalcitrance à la dégradation et de leur persistance dans l'environnement, leur traitement s'avère très difficile, ce qui constitue ainsi l'une des préoccupations majeures pour la préservation de l'environnement et de la santé des êtres vivants.

La contamination de l'environnement par les métaux lourds, se pose en raison de nombreuses activités industrielles, telles que les galvanoplasties, l'industrie de finition de métal, l'industrie métallurgique, les opérations de la tannerie, l'industrie des engrais et des batteries, l'industrie du papier et des pesticides, la fabrication des produits chimiques. Les métaux lourds sont aussi utilisés dans la fabrication des allumettes, des explosifs, des matériaux photographiques, des carburants et des procédés d'impression (Norton *et al.*, 2004 ; Jin-Ho Joo, 2010).

La pollution des sols et des eaux constitue aujourd'hui un fléau majeur de l'Algérie moderne. La demande de plus en plus croissante en produits alimentaires a conduit à l'utilisation de nombreuses substances chimiques (engrais chimiques, phytosanitaires...) en quantités souvent importantes comme facteur de production (Bachari *et al.*, 2011). Ces pratiques culturelles ont eu pour conséquences, non seulement une fragilisation des sols (vulnérabilité des sols), mais aussi une pollution importante des eaux dont celle due aux métaux lourds toxiques qui représente un danger pour l'écosystème, à prendre sérieusement en charge (Gabr *et al.*, 2008 ; Chun-yu Jiang *et al.*, 2008).

Face à des réglementations plus rigoureuses, les métaux lourds sont considérés aujourd'hui comme des polluants environnementaux à danger majeur, qui devraient être retirés et éliminés des eaux usées et de l'environnement. Pour assurer un tel traitement, plusieurs méthodes sont utilisées.

Par conséquent, l'élimination des métaux lourds toxiques de manière rentable et écologique est donc d'une grande importance. Le traitement biologique, basé sur des micro-organismes vivants ou non vivants (la bioremédiation) ou sur des plantes (la phytoremédiation) offre la

réduction des concentrations des métaux toxiques aux limites de l'acceptable pour l'environnement (Gabr *et al.*, 2008).

Diverses méthodes pour l'élimination des métaux lourds des eaux usées ont été étudiées. Les méthodes actuelles, chimiques et électrochimiques, utilisées pour traiter les métaux lourds dans les eaux usées sont très onéreuses, souvent inefficaces quand elles sont appliquées pour des métaux présents en faible concentration (état de trace) (Pardo *et al.*, 2003).

Ces dernières années, l'attention des chercheurs a porté sur les méthodes biologiques pour le traitement des effluents, dont certains sont en voie de commercialisation (Prasad et Freitas, 2003). Il y a trois principaux avantages des technologies biologiques pour l'élimination des polluants :

- Elles peuvent être réalisées *in situ* sur le site contaminé ;
- Généralement inoffensives pour l'environnement (aucune pollution secondaire) ;
- Sont rentables.

Notre travail consiste en l'étude de l'effet de deux bactéries rhizosphériques, productrices d'exopolysaccharides (*B. fungorum* Bf01 et *P. putida* Pp01) sur l'élimination des métaux lourds en solution : Cd, Zn et Cu.

## Partie A : Généralités sur les métaux lourds

Le monde, l'environnement et les sociétés dans lesquelles nous vivons ont rendu la contamination du corps impossible à ignorer. Les contaminants pénètrent dans notre corps par l'alimentation, la respiration, l'absorption cutanée et l'exposition quotidienne aux innombrables produits chimiques créés et employés par les humains.

### I. Qu'est ce qu'un métal lourd ?

La notion de "métaux lourds" possède plusieurs définitions différentes : « heavy metal », qui implique une notion de toxicité, et le terme « éléments-traces métalliques » (ETM), car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement. Dans ce contexte, nous utiliserons le terme « métaux lourds » dans le sens de l'impact toxique sur les humains et les environnements (Baker et Walker, 1989 ; Untereiner et Meunier, 2008).

Ce sont des éléments ayant des masses atomiques entre 63,5 et 200,6 et une densité supérieure à 5.0 (Srivastava et Majumder, 2008). Pour d'autres, il s'agit des éléments métalliques compris entre le cuivre et le plomb dans le tableau périodique des éléments, excluant donc le fer et le chrome (Untereiner et Meunier, 2008).

D'un point de vue purement *chimique*, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux.

D'un point de vue *physique*, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g/cm<sup>3</sup>.

D'un point de vue *biologique*, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques (Untereiner et Meunier, 2008).

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible, de l'ordre du nanomolaire, dans les tissus biologiques (Loué, 1993). Certains peuvent devenir toxiques, lorsque la concentration dépasse un certain seuil, c'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe). Par exemple, le zinc, à la concentration du millimolaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénases, protéinase, peptidase) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des

glucides et des lipides (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Le zinc est un cofacteur des ADN polymérasés et le nickel est nécessaire à certaines uréases.

Au vu de la grande variété d'ETM (plus de cinquante éléments) et de leurs effets biologiques, la bactérie doit réguler leur concentration intracellulaire et son homéostasie (Nies, 1999). La concentration de ces éléments doit rester homéostatique, sans atteindre des niveaux toxiques (Untereiner et Meunier, 2008).

## II. Sources des métaux lourds

Les métaux lourds qui entrent dans l'environnement aquatique proviennent de sources naturelles et de sources anthropogènes. Leur entrée peut être le résultat soit de déversements effectués directement dans les écosystèmes marins et dans les eaux douces, soit d'un cheminement indirect comme dans le cas des décharges sèches et humides et du ruissellement agricole.

**Tableau I.** Sources des métaux lourds (Zoller, 1984)

Sources naturelles	Sources anthropogènes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'activité volcanique,</li> <li>• L'altération des continents et les incendies de forêts.</li> <li>• Le dégazage des terres et des océans (cas du mercure).</li> <li>• Activité thermique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les effluents d'extractions minières</li> <li>• Les effluents industriels</li> <li>• Les effluents domestiques et ruissellements orageux urbains</li> <li>• Le lessivage de métaux provenant de décharges d'ordures ménagères et de résidus solides</li> <li>• Les apports des métaux provenant de zones rurales (les pesticides),</li> <li>• Les sources atmosphériques, (combustion de carburants fossiles, incinération des déchets et émissions industrielles),</li> <li>• L'activité pétrochimique.</li> </ul>

**Tableau II.** Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement (Biney *et al.*, 1992).

Utilisations	Métaux
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Batteries et autres appareils électriques</li> <li>• Pigments et peintures</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Ni</li> <li>• Ti, Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Sn, Cr, Al, As, Cu, Fe</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alliages et soudures</li> <li>• Biocides (pesticides, herbicides, conservateurs)</li> <li>• Agents de catalyse</li> <li>• Verre</li> <li>• Engrais</li> <li>• Matières plastiques</li> <li>• Produits dentaires et cosmétiques</li> <li>• Textiles</li> <li>• Raffineries</li> <li>• Carburants</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cd, As, Pb, Zn, Mn, Sn, Ni, Cu</li> <li>• As, Hg, Pb, Cu, Sn, Zn, Mn</li> <li>• Ni, Hg, Pb, Cu, Sn</li> <li>• As, Sn, Mn</li> <li>• Cd, Hg, Pb, Al, As, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn</li> <li>• Cd, Sn, Pb</li> <li>• Sn, Hg, As</li> <li>• Cr, Fe, Al</li> <li>• Ni, V, Pb, Fe, Mn, Zn</li> <li>• Ni, Hg, Cu, Fe, Mn, Pb, Cd</li> </ul>

### III. Données toxicologiques sur les métaux lourds

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a publié en 1972 les données toxicologiques sur les "métaux lourds" et leurs doses maximales tolérables dans l'alimentation. Le terme "métaux lourds" évoque tout naturellement une densité et un poids atomique élevés.

L'utilisation industrielle accrue des métaux et des produits chimiques entraîne une augmentation importante des concentrations de métaux dans l'environnement. Contrairement aux contaminants organiques, les métaux lourds ne sont pas biodégradables et ont tendance à s'accumuler dans les organismes vivants et de nombreux de leurs ions sont connus pour être toxiques ou cancérigènes, même à très faibles concentrations. Les métaux lourds toxiques à inquiétude particulière dans le traitement des eaux usées industrielles comprennent : le zinc, le cuivre, le nickel, le mercure, le cadmium, le plomb et le chrome (Pardo *et al.*, 2003).

#### III.1. Le Cadmium

##### III.1.1 Généralités sur le Cadmium (Cd)

Élément naturel de numéro atomique  $Z = 48$ , abrégé en Cd, présent dans certains minerais sous forme d'impuretés. Il fût utilisé pour ses caractéristiques physico-chimiques notamment

dans les batteries pour la protection de l'acier contre la corrosion (cadmiage) et comme stabilisant pour les plastiques et les pigments. C'est un métal argenté qui ternit à l'air. Il est soluble dans les acides, mais pas en milieu alcalin. C'est le 65<sup>ème</sup> élément naturel le plus abondant de la croûte terrestre. On le trouve dans les piles, soudures, accumulateurs, pigments de peinture, produits pour la photogravure, les engrais et les pesticides.

Dans l'environnement, il n'est presque jamais trouvé à l'état métallique, mais dans son état d'oxydation unique, c'est à dire +II. Les principaux composés du cadmium sont l'oxyde de cadmium, le chlorure de cadmium, le sulfure de cadmium (Bisson *et al.*, 2011).

### III.1.2 Le cadmium dans l'environnement

**Dans l'eau**, Le cadmium à l'état métallique n'est pas soluble ; ses sels le sont plus ou moins, en fonction du pH. En milieu aquatique, le cadmium est relativement mobile et peut être transporté sous forme de cations hydratés ou de complexes organiques ou inorganiques (Bisson *et al.*, 2011). La concentration du cadmium dans l'eau douce non polluée est généralement inférieure à 0,001 mg/L et celle de l'eau de mer d'environ 0,00015 mg/L (Fleischer *et al.*, 1974 ; Hiatt et Huff, 1975 ).

Les eaux superficielles contenant plus de quelques microgrammes de cadmium par litre sont probablement polluées par les rejets des usines métallurgiques, des ateliers d'électroplastique, des fabriques de pigments cadmiés, de textiles, de plastiques stabilisés au cadmium, ou par les boues d'épuration (Fleischer *et al.*, 1974).

L'eau potable contient de faibles concentrations en cadmium (inférieures à 0,001 mg/L), lorsqu'elle provient de sources d'approvisionnement non polluées. Le cadmium présent comme impureté dans les tuyaux galvanisés, ou comme métal dans les baguettes de soudage ou de brasage des tuyauteries des chauffe-eau et des fontaines réfrigérées, peut contaminer l'eau peu avant sa distribution (Nordberg, 1974).

**Dans l'air**, le cadmium est présent sous forme particulaire, la principale forme étant l'oxyde de cadmium. Ses fortes concentrations sont le lot de l'activité industrielle ainsi que le trafic routier (Hiatt et Huff, 1975). Dans les régions non industrielles, la concentration de cadmium dans l'air se situe autour de 0,000001 mg/m<sup>3</sup> (Friberg *et al.*, 1974).

**Dans les sols**, le cadmium est assez mobile néanmoins, il a tendance à s'accumuler dans les horizons supérieurs, riches en matière organique. La mobilité du cadmium est essentiellement fonction du pH, son adsorption par la phase solide du sol pouvant être 3 fois plus importante lorsque le pH augmente d'une unité entre 4-8. Dans l'eau du sol, il existe sous forme soluble:

CdCl<sub>2</sub>, CdSO<sub>4</sub> ou sous forme de complexes insolubles inorganiques ou organiques (Bisson *et al.*, 2011).

### III.1.3 La toxicité du cadmium

La concentration admissible du cadmium dans l'eau potable est inférieure à 0,005 mg/L en fonction des critères d'ordre sanitaire (Yan-Hui Li *et al.*, 2003). L'apport hebdomadaire maximal admissible de cadmium pour l'adulte se situe entre 0,4 et 0,5 mg. La consommation quotidienne d'eau à la concentration maximale acceptable de cadmium fournirait environ 12% de l'apport maximal admissible (Frangi, 2006).

Le cadmium à l'état de métal (CdO) sous forme divisée (poussières) peut pénétrer dans l'organisme par les voies respiratoires déjà au niveau de la cavité nasale, mais surtout dans le tractus pulmonaire (bronches et alvéoles), qui peut ainsi passer dans le sang, se répartir dans l'organisme et entraîner des effets toxiques au niveau de différentes cibles (poumons, reins, os, prostate, pancréas, thyroïde, vésicule biliaire...). Une exposition prolongée ou très intense peut provoquer une inflammation massive du parenchyme pulmonaire entraînant une pneumonie chimique sévère, « la pneumopathie cadmique » dont le taux de décès s'élève à 20%. La symptomatologie peut n'apparaître qu'après une phase de latence trompeuse. De ce fait le cadmium métallique et ses composés divalents sont classés cancérigènes chez l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer : le CIRC (Frangi, 2006).

## III.2. Le zinc

### III.2.1. Généralités sur le zinc (Zn)

Le zinc est un élément abondant qui constitue à peu près 0,004% de la croûte terrestre. La forme minérale la plus commune du zinc est la sphalérite (ZnS), qui est souvent associée aux sulfures de certains autres éléments métalliques tels que le plomb, le cuivre, le cadmium et le fer (Browning, 1969).

L'oxyde de zinc sert à la fabrication de peinture, de caoutchouc, de fils, d'encre, d'allumettes et de produits chimiques. La «poussière» de zinc est utilisée en imprimerie ou pour teindre les tissus, purifier les graisses, ou cémenter les métaux dans des procédés métallurgiques. Le zinc laminé est utilisé dans les pièces ornementales et dans les batteries (Malle, 1992).

### III.2.2. Le zinc dans l'environnement

Le zinc est présent de façon naturelle dans l'air, l'eau, le sol et dans la plupart des roches et de nombreux minéraux en proportions diverses dont les diverses conditions biologique et

physico-chimiques, telles que les variations saisonnières, constituent les principales sources de la teneur naturelle du zinc dans l'eau et dans le sol et il est plus mobile et biodisponible par exemple en milieu acide qu'en milieu basique (Malle, 1992).

### *III.2.3. Le zinc et la santé : Un oligo-élément indispensable à faible dose*

Le zinc est essentiellement contenu dans la viande rouge et il ne semble pas exister de forme de stockage de ce métal dans l'organisme humain. Une carence patente en zinc est notée dans près d'un tiers de la population mondiale, essentiellement liée à la sous-alimentation. Il est présent dans plusieurs enzymes, participe aux échanges oxygène-gaz carbonique par les globules rouges (Lazzerini, 2007).

Des données récentes montrent qu'il peut aussi y avoir des carences dans les populations de pays riches, liées à une alimentation mal équilibrée (Sandstead *et al.*, 2008). Ces mêmes observations sont relevées dans des pays où les principales sources de protéines sont les céréales, surtout chez l'enfant et la personne âgée (Meydani *et al.*, 2007). Un déficit, même léger, a un impact sur certaines fonctions immunitaires (Dardenne, 2002) responsable de la défense vis-à-vis de certaines infections. Il peut induire une sensibilité accrue à certaines infections bactériennes (pneumonie) ou virales (diarrhées, infections des voies respiratoires), un retard de croissance, l'hypogonadisme, l'anorexie, la léthargie, les modifications cutanées et la cécité nocturne (David *et al.*, 1984 ; Fraker, 1977 ; Fritzherbert, 1976 ; Prasad, 1983 ; Pohit, *et al.*, 1985), ralentir la guérison des blessures (Senapati et Thompson, 1985).

Aucune toxicité n'a été signalée pour le zinc d'origine alimentaire, bien que l'exposition professionnelle ou les interventions pharmacologiques puissent produire des symptômes (Prasad *et al.*, 1978). Des effets tératogènes ont été signalés chez le mouton (Campbell et Mills, 1979) ainsi qu'une rupture du métabolisme du cholestérol et l'altération des réactions immunitaires par l'absorption de trop grandes quantités de zinc chez l'homme (Chandra, 1984).

### *III.2.4. Le zinc : un polluant à forte dose*

Le zinc est l'un des éléments traces métalliques (ETM) qui devient un contaminant et un polluant au delà des doses qui le rendent écotoxique, qui varient selon les espèces, et le contexte. On l'a d'abord constaté dans et autour des raffineries de zinc, où seules quelques espèces résistent bien aux sols contaminés par ce métal. Le zinc du sol ou apporté par l'eau, l'air ou les boues d'épuration, peut à certaines doses s'avérer écotoxique pour des plantes cultivées, telles que le soja (Borkert *et al.*, 1998 ; Smith, 2009; Heemsbergen *et al.*, 2010), ou

non toxique pour la plante, mais capable de s'y bioaccumuler dans les parties comestibles comme les feuilles et les graines (Priester *et al.*, 2012).

### III.3. Le cuivre

#### III.3.1. Généralités sur le cuivre(Cu)

Le cuivre est un oligo-élément indispensable au métabolisme des êtres vivants. Il existe à l'état natif et est extrait d'une grande variété de minerais. Il se rencontre surtout sous forme de sulfures CuS et Cu<sub>2</sub>S, et sous forme d'oxydes Cu<sub>2</sub>O. La teneur en cuivre dans les minerais varie de 0,5 à 5 %.

L'ion Cu<sup>2+</sup> forme de nombreux complexes stables avec des ligands minéraux, comme les chlorures ou l'ammonium, ou avec des ligands organiques (Dameron et Howe, 1998 ; Bisson *et al.*, 2005).

L'oxyde cuivreux Cu<sub>2</sub>O est insoluble dans l'eau, alors que les formes CuSO<sub>4</sub>, Cu(OH)<sub>2</sub> et CuCl<sub>2</sub> le sont. La majorité du cuivre rejeté dans l'eau est sous forme particulaire et tend à se déposer, à précipiter ou à s'adsorber à la matière organique, au fer hydraté, aux oxydes de manganèse ou aux argiles. Dans l'eau, le cuivre particulaire représenterait de 40 à 90 % du cuivre (Bisson *et al.*, 2005).

Le cuivre métallique est utilisé dans tous les domaines de l'électricité, pour des appareils de chauffage et dans de nombreux alliages, comme catalyseur de réactions chimiques, etc... Les sels de cuivre sont utilisés dans l'industrie textile, les tanneries, l'industrie photographique, les traitements de surface, la céramique, les insecticides, etc...

La forme hydratée est utilisée comme fongicide agricole, bactéricide et herbicides. Il entre par exemple dans la composition de la bouillie bordelaise utilisée pour le traitement des vignes (Brémond et Vuichard, 1973).

#### III.3.2. Le cuivre dans l'environnement

La production du cuivre a augmenté lors des dernières décennies et, de ce fait, les quantités de cuivre dans l'environnement ont augmenté. La plupart des composés du cuivre se déposent et se lient aux sédiments de l'eau ou aux particules du sol. Les composés solubles du cuivre forment la plus grande menace pour la santé humaine. En général, les composés solubles du cuivre se retrouvent dans l'environnement après y avoir été rejeté. La concentration en cuivre de l'air est en général assez faible (Bisson *et al.*, 2005).

### III.3.3. Effet du cuivre sur la santé

Le cuivre est un élément essentiel chez l'homme et l'animal. Il est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques, notamment dans la formation d'hémoglobine et la maturation des polynucléaires neutrophiles. De plus, il est un cofacteur spécifique de nombreuses enzymes et métalloprotéines de structure, intervenant dans le métabolisme oxydatif, la respiration cellulaire, la pigmentation. Il a une importance capitale dans l'entretien des processus biologiques (Bisson *et al.*, 2005).

Une exposition au cuivre à long terme peut provoquer une irritation au nez, à la bouche et aux yeux. Elle peut aussi provoquer des maux de tête, des maux d'estomac, des vertiges, des vomissements et des diarrhées. Les prises intentionnelles de fortes doses de cuivre peuvent provoquer des dommages au niveau des reins, du foie et même quelques fois entraîner la mort (Bisson *et al.*, 2005).

## Partie B : La résorption des métaux lourds

Les méthodes classiques de révoation des métaux lourds des effluents industriels incluent généralement la précipitation chimique, l'oxydation chimique ou réduction, l'échange d'ions, la filtration, le traitement électrochimique, l'osmose inverse, les technologies membranaires et la récupération par évaporation (Kratochvil et Volesky, 1998; Norton *et al.*, 2004; Vinopal *et al.*, 2007; Green-Ruiz *et al.*, 2008; Tsekova *et al.*, 2010; Jin-Ho Joo *et al.*, 2010).

Ces processus peuvent être inefficaces; surtout quand les métaux en solution sont de l'ordre de 1 – 100 mg/l, la production de boues chimiques toxiques et leurs élimination, devient alors une affaire onéreuse, conduisant très souvent à des problèmes écologiques (Nourbakhsh *et al.*, 1994).

Le traitement biologique, basé sur l'utilisation de micro-organismes a été utilisé comme solution conventionnelle aux problèmes évoqués, peut conduire à la réduction des teneurs en métaux toxiques aux limites de l'acceptable pour l'environnement (Gabr *et al.*, 2008).

Parmi les différentes méthodes biologiques, la bioaccumulation et la biosorption, caractérisées par un bon potentiel d'élimination des métaux lourds (Volesky et Holan, 1995; Malik, 2004). La bioaccumulation est définie comme un phénomène de rétention des substances toxiques par les cellules vivantes, tandis que, les mécanismes de biosorption sont basés sur l'utilisation de la biomasse inerte.

### I. Procédés d'éliminations des métaux lourds

Les techniques de traitement des eaux usées reposent essentiellement sur des procédés d'élimination des métaux lourds. Elles présentent de nombreux avantages avec des limites.

#### I.1. Les procédés chimiques

- *L'échange d'ions* a été largement appliqué pour l'élimination des métaux lourds des eaux usées. Toutefois, les résines échangeuses d'ions doivent être régénérées par des réactifs chimiques quand elles sont épuisées. En plus du coût élevé, cette pratique peut causer de graves pollutions secondaires, surtout lorsque le traitement d'une grande quantité d'eaux usées contenant des métaux lourds en faible concentration (Fenglian *et al.*, 2011).
- *La coagulation-floculation* des métaux lourds pour le traitement des eaux usées, est un nouveau procédé qui s'est avéré très prometteur dans ce domaine, où des boues de

décantation et de déshydratation de bonnes caractéristiques sont produites. Mais cette méthode implique la consommation des produits chimiques et l'augmentation du volume des boues (Fenglian *et al.*, 2011).

- *La flottation* offre plusieurs avantages, telles que la sélectivité élevée en métaux, l'efficacité d'élimination élevée, les périodes de détention faibles, et la production de boues plus concentrées (Rubio *et al.*, 2002). Mais les inconvénients impliquent le coût élevé du capital initial, de maintenance élevée et des coûts d'exploitation.
- *Les techniques électrochimiques* sont considérées comme rapides et bien contrôlées qui exigent moins de produits chimiques, et fournissent de bons rendements et produisent moins de boues. Toutefois, ces technologies impliquent des investissements initiaux et une fourniture d'électricité coûteuse, ce qui limite leur développement (Fenglian *et al.*, 2011).
- *L'adsorption* est reconnue pour l'élimination des métaux lourds des eaux usées qui sont en faible concentration. Le coût élevé du charbon actif limite son utilisation. Beaucoup de variétés d'adsorbants de faible coût ont été développés et testés pour éliminer les ions de métaux lourds. Cependant, l'efficacité de l'adsorption dépend du type de l'adsorbant. La biosorption des métaux lourds des solutions aqueuses est un processus relativement basé sur la technologie de filtration membranaire et elle s'avère très efficace (Fenglian *et al.*, 2011).

Bien que ces techniques soient très efficaces pour certains types de contaminants présents dans le milieu, elles présentent cependant de nombreux inconvénients. Pour la décontamination des sols par exemple, les interventions sont lourdes et onéreuses et produisent en général un sol stérile. Par exemple, le traitement chimique par lavage élimine aussi les microorganismes telluriques et l'humus (Kurniawan *et al.*, 2006).

## **I.2. Les procédés biologiques**

- *La phytoremédiation*, est l'utilisation des plantes pour l'extraction des produits toxiques à partir du sol, plus particulièrement les métaux lourds. Son principe est d'éliminer ou transformer les polluants organiques ou inorganiques présents dans les milieux solides (sols), liquides (eaux de surface et souterraines) et gazeux, en composés moins toxiques. Elle est passée depuis une dizaine d'années de la phase conceptuelle à la phase commerciale. Plusieurs travaux de recherche ont montré que certaines plantes peuvent accumuler des métaux lourds toxiques tels que As, Se, Zn, Fe, Ni, Co, Pb, Mn, Hg, Cr et Cu (Chandrasekhar *et al.*, 2003, Prasad et Freitas, 2000). La phytoremédiation

regroupe: la phytoextraction, la rhizofiltration, la phytostabilisation, la phytovolatilisation, la phytodégradation (Abdelly, 2007).

- *La bioremédiation* consiste à utiliser des systèmes biologiques et plus précisément des microorganismes pour réduire le niveau de pollution qui contamine le cycle biogéochimique des substances naturelles dans l'air, l'eau ou le sol. La bioremédiation est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement (Abdelly, 2007).

Le procédé de la bioremédiation consiste à activer la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes, la plupart des temps microscopiques (bactéries, microalgues et champignons) à dégrader les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique. Ces microorganismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou exogènes (ajoutés au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol (bioaugmentation).

Les principales technologies utilisées dans la bioremédiation sont: La bioaugmentation, la biofiltration, la biostimulation, le compostage et la biolixiviation (Malik, 2004 ; Vijayaraghavan et Yun, 2008 ; Volesky, 1990).

### **I.3. La biomasse exploitée dans la bioremédiation des métaux lourds**

- *La biomasse fongique*

Les moisissures et les levures sont faciles à cultiver, produisent des rendements élevés de la biomasse et en même temps peuvent être génétiquement et morphologiquement manipulés. Beaucoup de travaux ont été réalisés dans ce domaine (Ahluwalia et Goyal, 2006).

- *La biomasse algale*

Les algues représente une biomasse naturelle renouvelable qui prolifère de façon ubiquitaire et abondamment dans les zones littorales du monde. Elles ont attiré l'attention de nombreux chercheurs qui les ont testé pour leur utilisation comme un nouvel adsorbant des ions métalliques. Leur grande disponibilité, faible coût, haute capacité de sorption des métaux, en font d'elles un matériel biologique de choix (Apiratikul et Pavasant, 2008).

- *La biomasse bactérienne*

Les bactéries peuvent absorber et accumuler une quantité importante d'ions métalliques, et ont été caractérisées pour leur application potentielle dans ce domaine. La biosorption des cations métalliques peut être due à des sites chargés négativement sur la paroi cellulaire bactérienne appelés groupes fonctionnels qui impliquent une internalisation ou non de ces ions à

l'intérieur de la cellule, provoquant leur immobilisation, ou encore due aux exopolysaccharides que la bactérie peut produire (Smith *et al.*, 1994 ; Untereiner *et al.*, 2008).

## **II. Les conditions physico-chimiques de la bioremédiation des métaux lourds**

Une analyse globale des résultats rapportés dans la littérature suggèrent ce qui suit à propos de l'influence des conditions d'exploitation sur l'équilibre du processus de biosorption.

### **II.1. Le pH**

Le pH semble être le facteur le plus important dans le processus de bioremédiation ; il affecte la chimie des métaux en solution, l'activité des groupes fonctionnels de la biomasse et la concurrence des ions métalliques (Veglio et Beolchini, 1996).

L'évaluation de l'élimination a généralement indiqué un processus fortement dépendant du pH avec la plus grande rétention à un pH voisin de la neutralité (Halttunen *et al.*, 2008) ou en milieu faiblement acide (Guiqiu Chen *et al.*, 2008 ; Low *et al.*, 1995).

La sorption des métaux peut se faire sur une large gamme de pH (de 3 à 8) (Rangsayatorn *et al.*, 2004) et chaque métal à un son pH optimum de rétention (Ozdemir *et al.*, 2003).

### **II.2. Le Temps de contact**

L'évaluation du temps de contact de la biomasse avec le métal au bout duquel le processus de la rétention commence, ou le temps suffisant pour qu'il y ait élimination complète, est une donnée importante pour l'appréciation de la résorption des métaux. En général, la bioremédiation est un processus très rapide qui commence au bout de quelques minutes (Volesky et May-Phillips, 1995), ou quelques heures de contact. Très souvent, un équilibre ainsi qu'une rétention presque complète sont établis au bout de seulement quelques minutes (Wu *et al.*, 2009), quelques heures (Verma et Shukla, 2000 ; Say *et al.*, 2001 ; Lodeiro *et al.*, 2005), ou quelques jours (Wang *et al.*, 1997) et peut se composer d'une seule phase (Blanco *et al.*, 1998).

### **II.3. La concentration initiale en ions métalliques**

La plupart des travaux montrent que l'efficacité de l'élimination des métaux a été jugée proportionnelle à la concentration initiale du métal (Modak *et al.*, 1996 ; Ozer *et al.*, 1997), mais elle ne l'est pas forcément avec la teneur en biomasse (Guiqiu Chen *et al.*, 2008).

#### **II.4. La compétition et la sélectivité**

La biosorption est sélective dans certains cas. Cet aspect doit être étudié en détail, car son mode de traitement est principalement utilisé pour traiter les eaux usées contenant des ions métalliques et la suppression d'un métal peut être influencée par la présence d'un ou de plusieurs métaux (Tsezos et Volesky, 1982).

Dans certains cas, la capacité de sorption d'un métal est plus élevée par rapport à un autre (en système binaire), sauf si la souche présente une importante affinité de biorésorption pour le second (sélectivité), ou elle est encore plus importante pour un même métal chez une souche par rapport à une autre. L'étendue de la sorption du métal dépend donc de la chimie des métaux, l'affinité pour les sites de liaison et le type du métal (Puranik et Paknikar, 1997 ; Sarabjeet Singh et Goyal, 2006).

La présence d'un second métal en solution diminue la liaison d'un autre déjà existant, sinon c'est une compétitivité pour les groupes fonctionnels. Ceci démontre que la présence des bactéries dans la rhizosphère peut entraîner la réduction des ions mobiles dans la solution du sol (Veglio et Beolchini, 1997 ; Lee *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2009).

Chez les plantes par exemple, la capacité d'absorption des différents métaux, peut être jugée différente entre les racines et les feuilles. L'absorption se fait dans l'ordre suivant au niveau racinaire Ni > Cd > Pb > Cu > Cr; tige Ni > Pb > Cu > Cd > Cr et Ni > Cd > Cu > Pb > Cr au niveau des feuilles (Prasad et Freitas, 2000).

#### **II.5. La concentration de la biomasse**

La concentration de la biomasse en solution semble influencer l'absorption spécifique des métaux lourds, où pour des valeurs faibles de teneur en biomasse il existe une augmentation de l'absorption spécifique. Gadd *et al.* (1988) ont suggéré qu'une augmentation de la concentration de la biomasse conduit à une interférence entre les sites de liaison. D'autres chercheurs ont invalidé cette hypothèse, en attribuant la responsabilité de la diminution de l'absorption spécifique à un manque de concentration de métal dans la solution par rapport à la concentration en biomasse. Cependant, ce facteur, doit être pris en compte dans toutes les applications de l'utilisation de la biomasse comme adsorbant.

#### **II.6. La température**

La température ne semble pas influencer les performances de bioremédiation dans la gamme 20-35°C, cependant elle influence la croissance microbienne ainsi que son métabolisme. La

température n'a pas d'influence sur l'adsorption du cadmium par les cellules de *Spirulina platensis* par exemple (Rangsayatorn *et al.*, 2004).

### III. Le mécanisme de rétention à travers la cellule microbienne (biorésorption)

Le mécanisme d'adsorption du métal par la biomasse microbienne se produit par le biais de la complexation, coordination, adsorption physique, chélation, échange d'ions, précipitation inorganique ou encore combinaison de ces procédés (Kratochvil et Volesky, 1998 ; Chen *et al.*, 2005 ; Akhtar *et al.*, 2008 ; Jin-Ho Joo 2010)

La paroi cellulaire microbienne est riche en polysaccharides et des glycoprotéines telles que glucanes, chitine, mannanes et phospho-mannanes. Ces polymères forment une source abondante de ligands pour la liaison du métal, contenant ce qu'on appelle groupes fonctionnels (Farkas, 1980).

#### III.1. Les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire bactérienne (Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>)

Une variété de groupes fonctionnels, présents sur la surface de la biomasse, sont connus pour être inclus dans la bioremédiation du métal et y participent d'une manière active. Il s'agit de carboxyle, carbonyle, amine, hydroxyle, phosphate et groupes sulfhydryle, pour immobiliser les ions métalliques (Volesky, 2003).

L'activité métabolique bactérienne peut créer un potentiel électrique à travers la membrane plasmique, appelé gradient de protons. Au cours du métabolisme aérobie, les protons sont pompés à travers la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule dans l'espace périplasmique, et des électrons ou des espèces chargés négativement tels que les OH<sup>-</sup> sont concentrés à l'intérieur de la cellule (Untereiner *et al.*, 2008). Cette étude démontre que l'état métabolique des bactéries peut influencer la mesure de l'adsorption passive des métaux sur des groupes fonctionnels de la paroi cellulaire.

À faible pH, les groupes fonctionnels situés sur la paroi cellulaire sont le plus souvent protonés, et par conséquent, peu ou pas d'adsorption de métal. Quand le pH augmente, les groupes fonctionnels de surface déprotonent successivement, ce qui entraîne la charge négative globale sur la paroi cellulaire et une augmentation du nombre de sites disponibles pour l'adsorption du métal (Kelly, 2006).

**Tableau III** Principaux groupements fonctionnels et constituants membranaires chez les bactéries (d'après Cox *et al.*, 1999).

Groupements fonctionnels	Constituants membranaires
Carboxyles R-COOH	acides lipotéichoïques LPS EPS
Phosphomonoesters R-OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	acides teichoïques LPS EPS
Phosphodiesters (RO) <sub>2</sub> -P(OH) <sub>2</sub>	peptidoglycane phospholipides
Amines R-NH <sup>3+</sup>	peptidoglycane phospholipides
Hydroxyles R-OH	Peptidoglycane

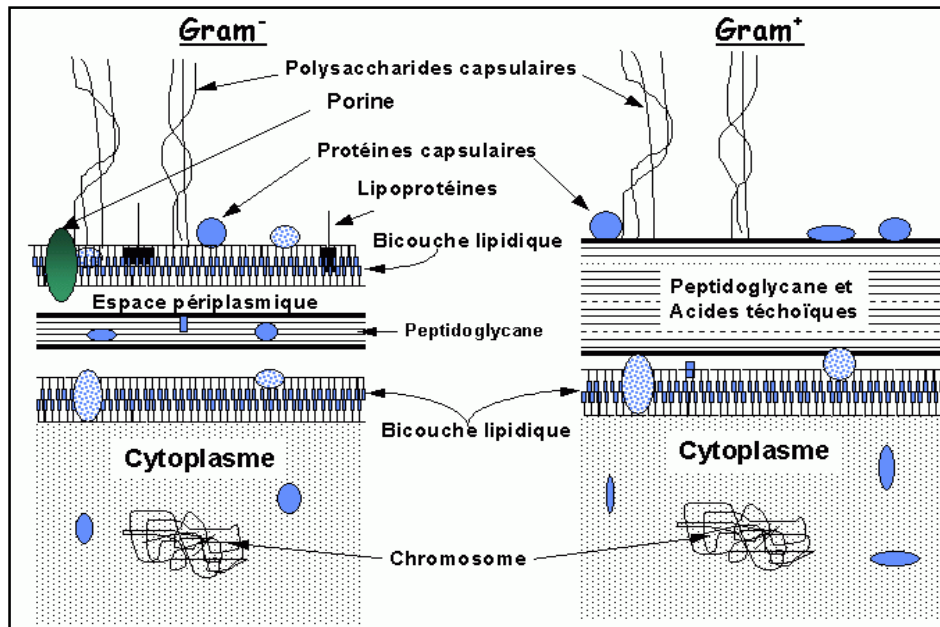
### III.1.1. Les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire des Gram positif

Le peptidoglycane constitue jusqu'à 50% de la paroi cellulaire en poids. L'acide teichoïque est lié à la paroi cellulaire des Gram positifs par des groupes phosphoryles, qui sont des sites actifs d'adsorption. L'acide téichoïque est lié de manière covalente aux sucres du peptidoglycane par une unité de liaison contenant deux sucres et un groupe phosphoryle, qui peut également être actif pour l'adsorption des cations métalliques (Kelly, 2006).

### III.1.2. Les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire des Gram négatif

La paroi cellulaire des Gram négatif comprend une quantité moindre de peptidoglycane que les bactéries Gram-positives et les cellules ont une membrane extérieure complexe, mais les constituants d'acides teichoïques et teichuronic n'y existent pas (Beveridge, 1999). La membrane externe de bactéries Gram négatif contient des phospholipides, des lipoprotéines, des lipopolysaccharides et des protéines diverses. Les phospholipides ont des groupes phosphoryles dans l'environnement local de même coordination que les groupes phosphoryles de l'acide teichoïque (Kelly, 2006).

La chaîne peptidique liant les deux sucres du peptidoglycane comprend quatre groupes d'acides aminés avec de l'acide D-glutamique et de l'acide mesodiaminopimelic (DAP) contenant les deux groupes carboxyles d'intérêt pour l'adsorption des cations métallique.



**Figure 1.** Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> (Bisognano, 2000)

### III.2. Interactions entre les bactéries et les métaux dans l'environnement

Certains métaux sont essentiels pour les microorganismes (K, Na, Mg, Ca...) et participent au fonctionnement des cellules. Dans certaines réactions catalytiques indispensables pour le fonctionnement de l'organisme, des métallo-enzymes ont besoin d'un ion métallique comme atome central. De plus, afin de générer de l'énergie, de nombreux microorganismes dépendent des composés métalliques comme donneurs d'électrons pour le métabolisme (le chimiotropisme), et comme accepteurs d'électrons pendant la respiration anaérobie. Il est courant de trouver des métaux à la surface des bactéries. En effet les ions métalliques sont un composant important des parois bactériennes (Kelly, 2006).

Malgré la présence d'ions toxiques, certains microorganismes sont capables de survivre dans des milieux pollués, ils peuvent même retenir ou éliminer certains éléments polluants de l'environnement. Cette capacité peut être le résultat de mécanismes induits ou intrinsèques aux individus (Gadd, 1992).

### III.2.1. Stratégies de survie des bactéries résistantes

Les métaux et leurs complexes, doivent d'abord diffuser du milieu externe à la surface de l'organisme. Ces complexes sont souvent dynamiques, capables de se dissocier et se réassocier (complexation/dissociation) avant d'atteindre la surface biologique. Pour avoir un effet, le métal doit, dans un premier temps, réagir avec un site sensible sur la membrane biologique (adsorption/désorption). Après adsorption, on observe souvent, mais non nécessairement une phase d'internalisation. L'ampleur de ces processus varie selon la nature chimique des composés, la taille, le type d'organisme et les conditions physicochimiques au voisinage de l'organisme (pH, concentrations de métal ou de ligand, potentiel membranaire). En outre, certaines réponses biologiques aux métaux (l'efflux, le changement de pH à l'interface biologique, les modifications de charge de surface etc...) influencent la physicochimie des métaux en solution et à l'interface et modifient ainsi le flux d'internalisation ou la concentration du métal bioaccumulé (Untereiner, 2008).

Le contrôle des concentrations internes (homéostasie), s'avère donc nécessaire. C'est pourquoi les bactéries ont développé différentes stratégies de défense pour se protéger de la toxicité des métaux dont:

- Les protéines de la famille « **Resistance-Nodulation-cell Division** » (RND), permettant la résistance via un mécanisme d'efflux. L'efficacité de ce système serait due au fait qu'il permette de diminuer la concentration cytoplasmique et périplasmique. Dans ce cas les cations peuvent être excrétés avant même leur entrée dans la cellule (Untereiner, 2008).
- La famille « **Cation Diffusion Facilitators** » (CDF) qui sont des systèmes d'efflux contrôlés par le gradient de concentration. Ces protéines sont généralement responsables de l'efflux des métaux présents dans le cytoplasme (Nies, 1999).
- La famille des « **P-type ATPases** », forment une grande famille de transporteurs actifs dont l'énergie provient de l'hydrolyse de l'ATP. Il existe des ATPases qui importent et d'autres qui vont exporter les métaux.
- Les microorganismes peuvent produire et rejeter vers l'extérieur des substances organiques tels les **Exo-polysaccharides**, susceptibles de modifier la mobilité des métaux en les immobilisant (précipitation, adsorption) par exemple, les rendant

ainsi insolubles : ce mécanisme est souvent décrit comme du « bioweathering » ou biolixiviation (Untereiner, 2008).

- La bioaccumulation des métaux lourds et leur stockage subséquent dans la cellule sous forme inerte permet à la cellule de diminuer leur toxicité. C'est par exemple le cas chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 qui réduit la sélénite sous forme de sélénium élémentaire et l'accumule sous forme de nodules dans le cytoplasme (Sarret *et al.*, 2005).
- Enfin, les métaux peuvent être biotransformés par des mécanismes d'oxydoréduction (Fe et Mn) liés à la respiration cellulaire, ou par alkylation (Hg). Ces transformations sont très importantes pour certaines bactéries en particulier les bactéries sulfato-réductrices et ont une incidence sur la biodisponibilité, la mobilité et la toxicité du métal. Les métaux toxiques peuvent être également transformés en une forme moins toxique voire non toxique par oxydation ou réduction enzymatique. Pour leur métabolisme énergétique, de nombreux procaryotes peuvent utiliser les métaux présents sous différents états d'oxydation (Cr, Mn, Fe, Co, Cu, As ou Se) comme donneurs ou accepteurs d'électrons (Ledin, 1996).

### III.2.2. Adsorption et croissance microbienne

Plusieurs travaux réalisés dans le domaine de la bioremédiation, utilisant des bactéries vivantes, ont montré qu'une grande partie du métal est éliminée pendant la phase active de croissance (phase exponentielle). D'autre part, une dépendance de la densité cellulaire sur la réduction des métaux est notée pendant cette phase (Sinha *et al.*, 2009), toutefois, une élimination régulière et constante pendant la phase stationnaire a été notée et jugée indépendante de la croissance des cellules (Chang *et al.*, 1997 ; Clifford *et al.*, 1997 ; Jo-Shu Chang *et al.*, 1997).

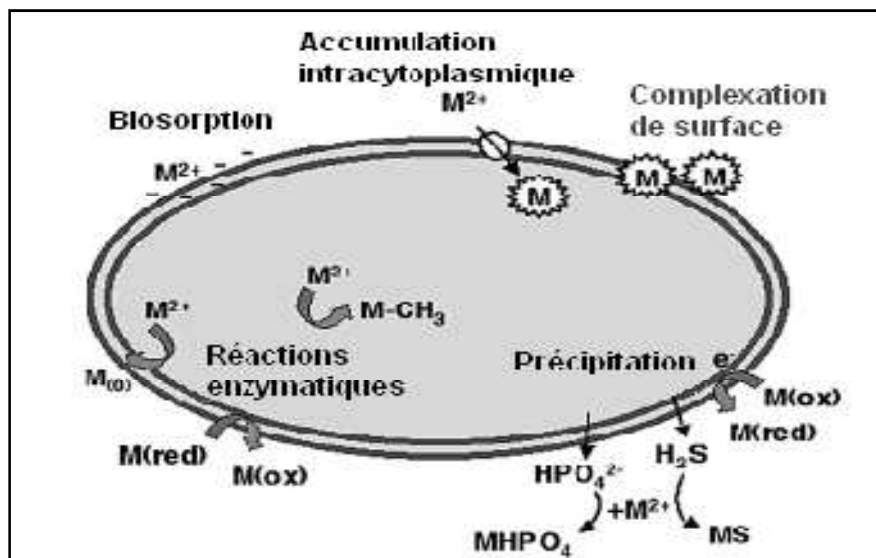
## IV. La rétention des métaux lourds dans l'environnement

Les activités microbiennes peuvent causer la dissolution, la mobilisation ou l'immobilisation des métaux lourds dans les sols et les eaux. On peut diviser ces processus selon que la bactérie soit directement impliquée ou non.

- Les interactions indirectes causent un changement de l'environnement local, du pH ou du potentiel d'oxydoréduction par exemple, ce qui peut provoquer un changement dans la spéciation des métaux.

- Les interactions directes, par contre, correspondent à l'action du microorganisme sur le métal, par oxydation, réduction, accumulation ou adsorption grâce à la cellule elle-même ou grâce à des molécules membranaires ou capsulaires comme des exopolymères. La séquestration dans un biofilm est aussi un autre moyen de réduire la mobilité des métaux, et pourrait être utilisée en bioremédiation (Panak *et al.* 1998., White et Gadd, 2000).

La figure 2. schématise ces principales interactions mises en évidence entre les métaux et les microorganismes.



**Figure 2.** Les différents mécanismes de résistance des bactéries contre les métaux (M) (Valls et Lorenzo, 2002)

#### IV.1. Biofilm et EPS pour la rétention des métaux lourds

##### IV.1.1. Qu'est ce qu'un biofilm ?

Un biofilm est défini comme une association structurée de microorganismes (bactéries, champignons etc...), se développant à une interface (eau/sol, eau/air, sol/air), sécrétant une matrice adhésive et protectrice appelée EPS (Nikolaev et Plakunov, 2007).

L'intérêt majeur du biofilm est de protéger les microorganismes y vivant, des divers stress environnementaux comme l'oxygène, la prédation, la dessiccation et les composés bactéricides.

#### *IV.1.2. Les biofilms pour la rétention des métaux lourds*

Au sein d'un biofilm, les anions exopolysaccharidiques affectent la pénétration des cations métalliques toxiques (Kumar *et al.*, 2007), où ils subissent différents phénomènes. Tout d'abord, ils réagissent avec les groupes phosphodiester et carboxylates, ce qui retarde leur diffusion dans le biofilm. Parallèlement, les cations métalliques se lient aussi de manière covalente avec les thiolates, sulfates et phosphates. Les métaux sont ainsi réellement séquestrés (Harrison *et al.*, 2007).

#### *IV.1.3. Qu'est ce que les exopolysaccharides ou EPS ?*

On peut les définir comme des polymères organiques, qui sont souvent responsables dans les biofilms, de la cohésion des cellules et de leur adhésion sur des substrats.

Les EPS sont les principaux responsables de l'intégrité fonctionnelle et structurale des biofilms, et déterminent en partie les propriétés physico-chimiques et biologiques des biofilms (Characklis et wilderer, 1989).

#### *IV.1.4. Rôles et intérêts des EPS pour la rétention des métaux lourds*

Des études ont permis d'extraire des exopolysaccharides bactériens d'origine hydrothermale à partir de bactéries extrémophiles, possédant un pouvoir de rétention des métaux lourds, essentiellement le zinc, le plomb, le cadmium et le fer. La quantité de métaux fixés était relativement élevée (Guezennec, 2001).

D'autres travaux ont également montré que les exopolymères des bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont capables d'interagir avec les métaux. En effet de nombreux exopolymères agissent en tant que polyanions portant une charge négative des contre-ions dont les métaux lourds (Beech et Cheung, 1995).

Certains auteurs rapportent également que la fraction protéique des EPS jouerait également une part importante dans la complexation des métaux. La liaison des métaux se fait ainsi par la biomasse et/ou par les EPS. Il a de plus été démontré que des biofilms des BSR exposées à du cadmium ou à du cuivre accumulent les formes solides du Cd et du Cu (CdS et CuS), qui ne semblent pas pénétrer à l'intérieur du biofilm (Garrido *et al.*, 2002).

### **V. Les microorganismes utilisés en bioremédiation**

Ils proviennent le plus souvent de milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes : des températures en dessous de 0°C ou au contraire, très élevées, dans des milieux inondés ou en plein désert, en présence d'un excès d'oxygène ou milieu anaérobie. En raison

de leur pouvoir d'adaptation, ces microorganismes sont utilisés pour éliminer les composés xénobiotiques.

Parmi les bactéries aérobies reconnues pour leur pouvoir de dégradation, nous pouvons citer celles appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium* et *Burkholderia*.

Elles peuvent dégrader les pesticides, les hydrocarbures, les alcanes et les composés polyaromatiques et les métaux lourds. Souvent, elles utilisent le polluant comme source de carbone et d'énergie.

Les bactéries anaérobies sont moins fréquentes que les aérobies, cependant, elles présentent un grand intérêt dans la bioremédiation des hydrocarbures. Dans tous les cas, l'opération implique le contrôle non seulement de la disponibilité des dépollueurs mais aussi l'ajustement en permanence des conditions optimales de leur efficacité: quantité et type de nutriments, concentration en oxygène, pH, température et salinité (Mamoun et Olivier, 1989 ; Beech et Cheung, 1995 ; pardo *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2005, O'Sullivan et Mahenthalingam, 2005).

## Partie C : Les modèles bactériens impliqués

L'utilisation de micro-organismes et plus particulièrement les bactéries pour dégrader des métaux lourds a évolué comme un rapport coût-efficacité pour une stratégie d'assainissement des sites contaminés.

Les genres *Pseudomonas* et *Burkholderia* furent des outils biologiques très efficaces, peu coûteux et disponibles pour la bioremédiation des métaux lourds des solutions aqueuses.

### I. *Pseudomonas putida*

#### I.1. Caractères bactériologiques

Les bactéries du genre *Pseudomonas* peuvent être définies comme des bacilles à Gram négatif, fins, droits, oxydase positive; aéro-anaérobies facultatives (Respiration nitrate chez certaines espèces); dégradant le glucose par respiration aérobie (voie oxydative et non fermentative). La mobilité est généralement faite par ciliature polaire (monotriche ou lophotriche).

Ce sont des bactéries à indole négatif; dépourvues de spores et de capsules, présentant des colonies souvent pigmentées. Elles apparaissent la plupart du temps isolées ou en diplobacilles.

Ce genre comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (dont l'espèce-type est *Pseudomonas aeruginosa*), cependant de nombreuses espèces sont en cours d'exclusion (de par les progrès de la phylogénétique) leur nombre est réduit et tend vers une soixantaine d'espèces.

#### I.2. Conditions de culture

Les *Pseudomonas* sont des germes peu exigeants, la majorité des espèces n'exige aucun facteur de croissance et sont capables d'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie un large spectre de substrats carbonés simples et variés.

Ils se développent sur tous les milieux usuels, même les plus simples. Ils sont alcalinophiles et possèdent aussi une grande tolérance dans les gammes de température environnante, bien qu'ayant une température optimale de croissance située entre 30- 35 °C (mésophile). Ils sont capables de se développer à des températures entre 4- 42°C en ralentissant leur métabolisme.

Ils résistent à de nombreux inhibiteurs bactériens, particulièrement aux agents chimiques et métaux lourds. Ils continuent leur développement dans certaines solutions antiseptiques et sont résistants à de nombreux antibiotiques (Baryshnikova *et al.*, 2001).

Les *Pseudomonas* fluorescents sont surtout actifs au niveau du rhizoplan où l'espèce *P. fluorescens* sensu stricto représente le taxon principal. Un groupe taxonomique intermédiaire entre *P. fluorescens* et *P. putida* s'est révélé caractéristique de la zone racinaire. Les germes ayant les plus fortes aptitudes à chélater le fer, sont également localisés proches de la rhizosphère (Mamoun et Olivier, 1989).

### **I.3. Tolérance du cuivre, du cadmium et du zinc chez *Pseudomonas putida***

Plusieurs chercheurs ont démontré la capacité élevée de *Pseudomonas putida* à tolérer et même à réduire les métaux lourds en solution aqueuse. En raison de sa croissance en présence de concentrations importantes en métaux et sa capacité d'adsorption élevée en conditions aérobies, cette bactérie pourrait être potentiellement utilisée dans des bioréacteurs ou *in situ* de système aqueux ou de sols contaminés aux métaux lourds (Chen *et al.*, 2005).

Dans plusieurs travaux, *Pseudomonas putida* a démontré des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) élevées pour les métaux notamment pour le zinc, cuivre et cadmium et il a été constaté que la toxicité du cuivre était supérieure à celle du zinc et du cadmium. *Pseudomonas putida* fut capable d'éliminer plus de 80% de ces métaux pendant le cycle actif de croissance (Chen *et al.*, 2005 ; pardo *et al.*, 2003) et la biorésorption peut atteindre l'équilibre au bout de 10 minutes de contact, avec des pH optimaux de 6.0, 5.0- 6.0, et 7.0-7.5 (pardo *et al.*, 2003).

### **I.4. Classification scientifique *Pseudomonas putida* (Migula, 1894)**

- Règne : *Bacteria*
- Division : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Pseudomonadales*
- Famille : *Pseudomonadaceae*
- Genre : *Pseudomonas*
- Espèce : *Pseudomonas putida*

## II. *Burkholderia fungorum*

*Burkholderia* est un genre bactérien composé d'environ 30 espèces qui sont endogènes au sol et la rhizosphère des plantes. Le genre *Burkholderia* a été isolé pour sa capacité à dégrader de nombreux métaux lourds. La diversité de la gamme de ces bactéries fait d'elles des agents de bioremédiation intéressants. Cependant et contrairement à ce potentiel, plusieurs espèces peuvent être pathogènes chez les patients immunodéprimés et ceux atteints de mucoviscidose. Il y a un potentiel commercial important pour des souches non pathogènes de *Burkholderia* (O'Sullivan et Mahenthiralingam, 2005). pardo *et al.*, 2003

### II.1. Caractères bactériologiques

La définition du genre *Burkholderia* repose avant tout sur des considérations génomiques et sur la composition des lipides cellulaires. Ce sont des bacilles droits, à Gram négatif, non sporulés, mobiles grâce à un ou à plusieurs flagelles polaires (*Burkholderia mallei* est cependant dépourvue de flagelles et immobile). Ils sont à métabolisme oxydatif, aérobies stricts, catalase positive, oxydase variable selon les espèces. La plupart des espèces, expriment de manière constitutive des exopolysaccharides de surface (microcapsule).

Le genre *Burkholderia* (auparavant faisant partie du genre *Pseudomonas*) regroupe un ensemble de bactéries qui colonisent une très large variété de niches écologiques, c'est virtuellement un genre ubiquiste.

*Burkholderia* est un genre phylogénétiquement cohérent dans le sous-embranchement des  $\beta$ -protéobactéries, qui se distingue par sa richesse fonctionnelle et sa polyvalence. Les espèces sont omniprésentes dans les écosystèmes terrestres naturels, comme le sol et la rhizosphère des végétaux (Coenye *et al.*, 2001).

La polyvalence écologique du genre *Burkholderia* a été attribuée à deux facteurs principaux : d'abord *Burkholderia* sont métaboliquement robustes en raison de l'énorme capacité de codage de leurs grands génomes multi répliquant, dont la taille varie de 6 à 9 Mo, et d'autre part leurs génomes contiennent un tableau de séquences d'insertion, qui favorisent la plasticité génomique et la capacité d'adaptation générale (O'Sullivan et Mahenthiralingam, 2005).

### II.2. Conditions de culture

Elles sont aérobies mais capable de croître en anaérobiose en présence de nitrate ou d'arginine. La température optimale de croissance est comprise entre 37-39 °C mais la plupart

des souches cultive bien à 42 °C. *Burkholderia pseudomallei* ne cultive pas à 5°C mais elle est capable de survivre plus de 6 mois à cette température.

Très peu exigeantes, la croissance est rapide sur les milieux ordinaires et les colonies obtenues après 24-48 heures d'incubation sur gélose peptonée sont petites, rondes, bombées, blanchâtres et d'un diamètre de 2 à 3 mm. Après 48-72 heures d'incubation, les colonies s'agrandissent (diamètre de 5 à 10 mm), elles sont opaques, de couleur crème et dégagent une odeur de terre ou de truffe (O'Sullivan et Mahenthiralingam, 2005).

### II.3. *Burkholderia sp*, a un pouvoir de bioremédiation et un effet PGPR

Les *Burkholderia* sont communément isolés des rhizosphères de plantes, ce qui les rend appropriés pour les stratégies de dégradation des polluants de la rhizosphère appelée rhizoremediation. La propriété des *Burkholderia* à promouvoir la croissance des plantes (effet PGPR) ainsi que leur effet comme biopesticides, leur confère un avantage comme outil de base et efficace pour développer des systèmes capables d'effectuer ces deux activités de biotechnologie (O'Sullivan et Mahenthiralingam, 2005).

Des travaux avaient montré qu'une souche bactérienne *Burkholderia sp*, résistante aux métaux lourds pouvait diminuer la solubilisation du plomb et du cadmium dans la culture en solution et dans les sols et permettre ainsi l'augmentation de façon significative de la biomasse des plantes de maïs et de la tomate. Ces bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) et adsorbant des métaux lourds, peuvent fournir une nouvelle ébauche pour la bioremédiation microbienne améliorée des sols pollués en métaux lourds (Jiang *et al.*, 2008). D'autres travaux avaient montré que *Burkholderia fungorum* pouvait diminuer la concentration du Cd grâce à sa capsule ou ses exopolysaccharides, le déposer dans l'enveloppe cellulaire, mais sans internalisation dans la cellule (Jun-Hui et Hang, 2012).

### II.4. Classification scientifique (Coenye *et al.* 2001)

- Règne : *Bacteria*
- Embranchement: *Protéobactéries*
- Classe: *Beta protéobactéries*
- Ordre: *Burkholderiales*
- Famille: *Burkholderiaceae*
- Genre: *Burkholderia*
- Espèce: *B. fungorum*
- Nom binomial ***Burkholderia fungorum***

## I. Matériel

### I.1. Matériel biologique et collecte des échantillons

Depuis les années 70, plusieurs travaux ont porté sur une gamme très variée de souches de microorganismes afin de déterminer leur aptitude à accumuler les métaux lourds.

#### I.1.1. Les bactéries

Les bactéries utilisées dans cette étude proviennent de sols rhizosphériques :

- La souche *Burkholderia fungorum* souche Bf01, isolée à partir d'endophytes d'arachides (*Arachis hypogea*) de l'oasis Sebseb (Ghardaia), au niveau du laboratoire biologie des sols par M<sup>me</sup> Djebara M, pendant l'année universitaire 2007, conservée dans des cryotubes à -70°C dans du glycérol à 20% (caractérisation moléculaire).
- La souche *Pseudomonas putida* souche Pp01, isolée au laboratoire physiologie végétale de la FSB -USTHB, à partir des racines de blé dur (*Triticum durum* L.) par M<sup>elle</sup> Bourahla M, en janvier 2012 (caractérisation partielle).

### I.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont:

#### I.2.1. Le milieu SLP (*Sucrose minimal salts Low Phosphates*)

C'est un milieu minimum standard, pauvre en phosphates, désigné pour éviter la précipitation des sels des métaux lourds à 50 mg/L (Chun-yu Jiang *et al.*, 2008). Le milieu SLP liquide est utilisé pour les cultures liquides (suspensions bactériennes) qui ont servi :

- L'ensemencement en surface dans l'étude du stress métallique des deux bactéries,
- L'étude de la biorésorption des métaux par *Burkholderia fungorum* souche Bf01
- Le suivi de la cinétique de croissance de *B.fungorum* souche Bf01 en présence et en absence du métal.

Le milieu SLP solide a servi pour l'étude du stress métallique des deux bactéries, en utilisant la méthode de diffusion sur plaque (Summer et Silver, 1972).

Il est constitué de :

- 1% de sucrose
- 0.1% (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>

- 0.05%  $K_2HPO_4$
- 0.05%  $MgSO_4$
- 0.01%  $NaCl$
- 0.05% Extrait de levure 15 g/l d'agar (pour le milieu solide)
- pH 7.4
- Stérilisation à l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

### **I.3. Solutions des métaux lourds**

Des solutions mères de métaux lourds de 10g/l et une gamme de concentration de 50 à 10000mg/L ont été utilisés, dont :

- Solution du cuivre
- Solution du cadmium
- Solution du zinc

## **II. Méthodes**

### **II.1. Repiquage des bactéries sur milieu solide (test de viabilité)**

Pour l'étude de la viabilité des cellules bactériennes, les bactéries ont été repiquées en stries sur milieux solides et mises à incuber à 28°C.

### **II.2. Préparation des solutions de métaux lourds**

Pour étudier l'influence des différentes concentrations en métal sur la croissance bactérienne, une large gamme de concentration pour chaque métal a été utilisée, à partir de solutions mères à 10 g/l pour le Cd, le Cu et le Zn.

Les solutions mères (à 10 g/L) ont été filtrées (à 45 $\mu$ m), puis utilisées. Une gamme de concentration de 50 à 10000 mg/L (0-50-100-200-300-400-500-1000-2000-3000-4000-5000-10000 mg/L) est préparée pour les différents tests bactériologiques, particulièrement la survie des bactéries en présence de métaux lourds.

Le tableau suivant représente cette dernière gamme :

**Tableau IV** Codification des concentrations des solutions des métaux lourds

<i>Code concentration</i>	<b>M</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<i>[C] mg/l</i>	10000	5000	4000	3000	2000	1000	500	400	300	200	100	50

### II.3. Préparation des suspensions bactériennes de *Burkholderia fungorum* et *Pseudomonas putida*

Les cellules en phase exponentielle de croissance (entre 12h et 15h d'incubation) des bactéries étudiées sur milieu SLP liquide sont recueillies pour tester leur résistance aux métaux lourds et déterminer ainsi les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ou MIC (Minimal Inhibitory Concentration) (Chun-yu Jiang *et al.*, 2008).

### II.4. Résistance de *Burkholderia fungorum* et *Pseudomonas putida* aux Cd, Cu et Zn

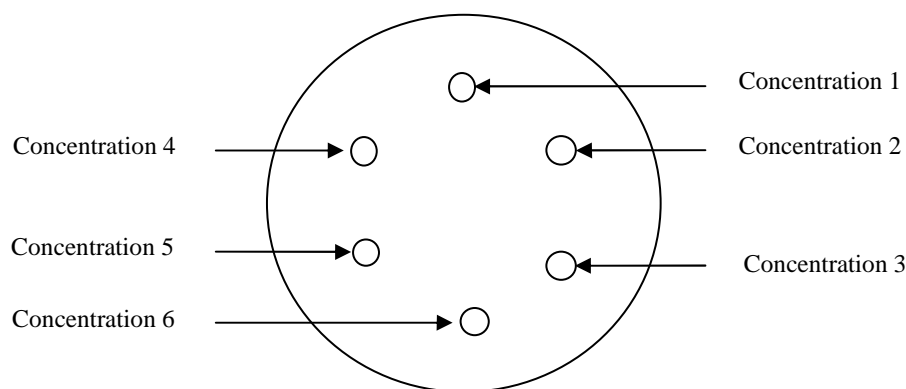
La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (MIC) est couramment utilisée pour déterminer la sensibilité d'une souche aux antibiotiques. L'application de cette technique pour d'autres éléments toxiques, permet de déterminer le seuil de résistance des bactéries à ces molécules (Untereiner, 2008).

La MIC d'un toxique est définie comme la concentration la plus faible de cette molécule capable d'empêcher le développement visible de la bactérie dans des conditions standardisées (Untereiner, 2008).

Dans ce travail, la MIC sera déterminée par diffusion en milieux solide sur boîte de Petri contenant le milieu SLP solide (Aleem *et al.*, 2003 ; Summer et Silver, 1972). Celle-ci est confirmée en milieu SLP. L'appréciation de la croissance est réalisée par la mesure de la densité optique à 600 nm (DO<sub>600</sub>). La MIC correspond alors à la plus faible concentration pour laquelle la croissance est nulle.

#### II.4.1. Protocole d'étude de la résistance par diffusion du métal sur milieu solide

Le milieu SLP solide est coulé à chaud en boîtes de Petri. L'ensemencement est réalisé en surface (suspension bactérienne de 12h à 15h). Après séchage, des petits puits sont confectionnés à l'aide d'un emporte pièce (3mm de diamètre), qui reçoivent chacun une concentration C en métal (10000 - 5000 - 4000 - 3000 - 2000 - 1000 - 500 - 400 - 300 - 200 - 100 - 50mg/L) respectivement codifiées (M, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Les boîtes de Petri sont ensuite incubées à 28°C pendant 7 jours (Fig.3).



**Figure 3.** Schéma du protocole de détermination de la MIC par diffusion sur milieu solide (méthode des puits). (Juan *et al.*, 2006)

#### II.4.2. Résistance des souches en milieu liquide et cinétique de viabilité

Les courbes de croissance bactérienne en milieu liquide (en présence et en absence de métal), sont évaluées par le suivi de la densité optique (absorbance à 600 nm).

##### - Suivi de la croissance bactérienne de *B. fungorum* en milieu liquide

Les courbes de croissance bactérienne sont réalisées en milieu liquide. La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 600 nm. L'effet des trois métaux lourds (Cd, Zn et Cu) sur la croissance est évalué, les courbes sont ainsi comparées au témoin (courbe de croissance bactérienne dans un milieu dépourvu de métal).

Lorsque les bactéries sont exposées à un toxique, les variations des paramètres caractéristiques de la croissance par rapport à ceux d'une culture témoin non exposée, permettent de définir les capacités de résistance de la souche à ce toxique (Untereiner, 2008). La détermination de la CMI en milieu liquide est réalisée dans des flacons (Schott) de 500 ml remplis au 1/5<sup>e</sup> du volume avec le milieu SLP dont le pH est ajusté à 6-6.5 pour Cd et Cu et à 7 pour Zn, pH correspondant au pH optimum de rétention de chacun de ces métaux (Vijayaraghavan et Yeoung-Sang Yun, 2008).

Ces dispositifs expérimentaux sont incubés à 28°C, sous agitation à 200 rpm (pour assurer l'oxygénation). La croissance bactérienne est effectuée par lecture de la densité optique à 600 nm et à différents temps (0, 15, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 heures).

- *Evaluation de la résistance bactérienne de B. fungorum en milieu liquide*

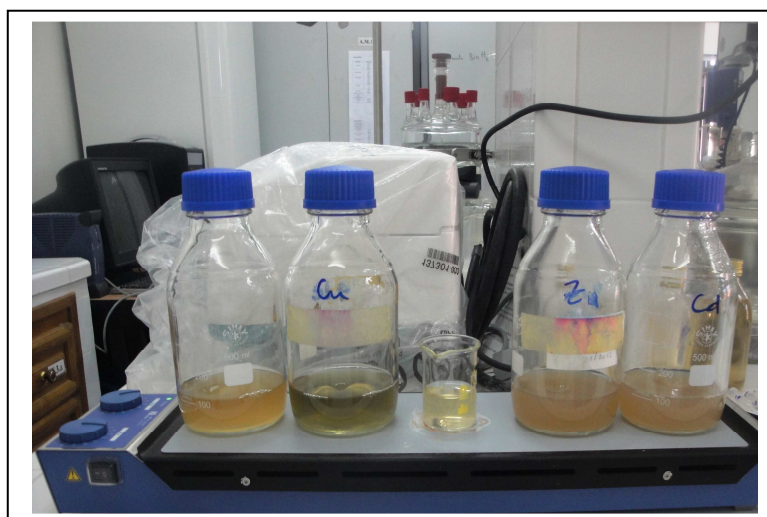
La lecture de la croissance par la mesure de la  $DO_{600}$  permet de déterminer la CMI en présence des métaux lourds et pour évaluer la résistance de la souche Bf01 aux Cu, Cd et Zn les taux de réduction de sa croissance en présence de différentes concentrations en chaque métal ont été calculés et notés en deux temps différents (à 24 heures et à 50 heures) en suivant l'équation :

$$\text{Taux de réduction de la croissance (\%)} = \left(1 - \frac{Y}{Y_t}\right) \times 100 \%, \text{ dont :}$$

Y : c'est la  $DO_{600}$  au point 24h ou 50h en présence d'une concentration  $x$  du métal

$Y_t$  : c'est la  $DO_{600}$  au point 24h ou 50h du témoin (en absence du métal)

- Le pH est également mesuré sur chaque aliquote prélevée de manière à déterminer l'évolution du pH durant l'expérimentation.



**Figure 4.** Suivi de la croissance de *B. fungorum* souche Bf01 en présence et en absence de métaux

## II.6. Elimination du Cd, Zn et Cu par *B. fungorum*

La quantité du métal résiduel est mesurée par analyse du milieu surnageant après centrifugation à 15000 rpm pendant 15min. Le métal éliminé de la solution aqueuse ou retenu par les cellules bactériennes est calculé en déterminant la différence entre la concentration initiale du métal et celle déterminée en fin d'expérimentation.

La quantification de l'accumulation du métal par la bactérie est déterminée par deux mesures complémentaires effectuées en parallèle : le dosage du métal résiduel et celui accumulé par les bactéries. Pour ce faire, des prélèvements sont effectués à des temps définis (0, 15, 24,

48,72, 96, 120, 144, 168 heures). La centrifugation permet de séparer le culot bactérien du surnageant de culture, auquel on ajoute 2ml/L d'acide nitrique (pour fixer et éviter la précipitation du métal). Le dosage du métal est réalisé par spectrophotométrie à absorption atomique-SAA. Mode Flamme (Chang Jo-Shu *et al.*, 1997). La quantité du métal éliminé est ainsi calculée, en déterminant la différence entre la **quantité initiale** (à  $t_0$ ) et la **quantité résiduelle**.

$$\text{Qté du métal éliminé} = \text{Qté du métal initial} - \text{Qté du métal résiduel}$$

Pour évaluer la vitesse du processus d'élimination du Cd, Zn et Cu, nous avons calculé la variation moyenne de la concentration de ces trois métaux par unité de temps avec l'équation :

$$\text{Variation moyenne de la concentration par unité de temps} = x = \frac{\Delta Cc}{\Delta t} = \frac{Cc1 - Cc2}{t1 - t2}$$

Dont :

$\Delta Cc$  : variation de la concentration en métal

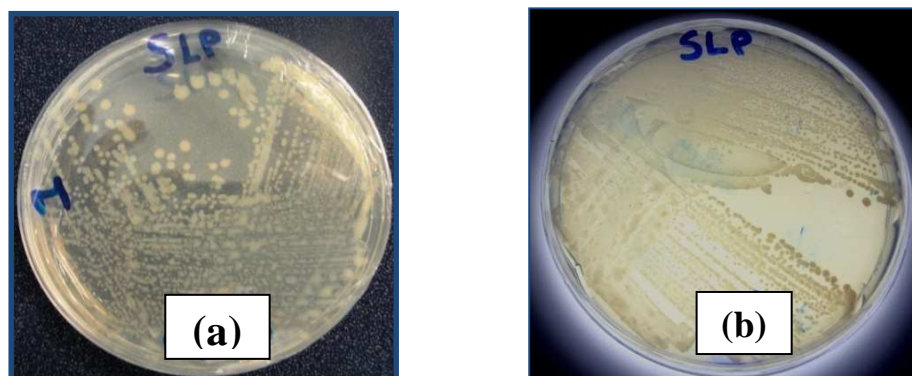
$\Delta t$  : variation de temps

**Cc1** : concentration 1 à temps 1

**Cc2** : concentration 2 à temps 2

L'étude de la résistance des deux souches bactériennes rhizosphériques : *Burkholderia fungorum* souche Bf01 et *Pseudomonas putida* souche Pp01, aux différentes concentrations en Cd, Zn et Cu ainsi que leur efficacité à éliminer ou à réduire les métaux lourds de l'eau, permettront le développement d'un outil biologique pour la bioremédiation.

### I. Test de viabilité de *P. putida* Pp01 et *B. fungorum* Bf01 sur milieu SLP solide



**Figure 5.** Morphologie des colonies bactériennes sur milieu SLP solide  
 (a) *Pseudomonas putida* souche Pp01, après 24h d'incubation à 28°C.  
 (b) *Burkholderia fungorum* souche Bf01, après 48h d'incubation à 28°C.

Les deux bactéries étudiées *Pseudomonas putida* souche Pp01 et *Burkholderia fungorum* souche Bf01 présentent une bonne croissance sur milieu SLP solide. Les colonies apparaissent après seulement 24h pour la souche Pp01 et après 48h pour la souche Bf01, à 28°C.

### II. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

#### II.1. La CMI sur milieu SLP solide

##### II.1.1. *Pseudomonas putida* souche Pp01

##### ➤ Le cuivre

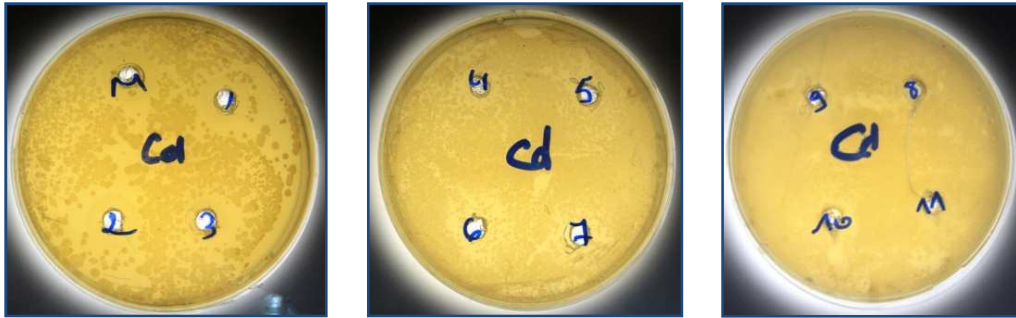


**Figure 6.** Effet de concentrations croissantes en Cuivre sur la croissance de *Pseudomonas putida* souche Pp01 en milieu SLP solide  
 (M: 10g/L - 1: 5g/L - 2: 4g/L - 3: 3g/L - 4: 2g/L - 5: 1g/L - 6: 0.5g/L - 7: 0.4g/L - 8: 0.3g/L - 9: 0.2 g/L - 10: 0.1g/L - 11: 0.05g/L)

La figure 6 montre des zones d'inhibition plus ou moins importantes autour des concentrations : 10 - 5 - 4 - 3 - 2 - 1 - 0.5 - 0.4 - 0.3 - 0.2 - 0.1 g/L. Ceci explique que la bactérie étudiée « *Pseudomonas putida* souche Pp01 » ne se développe pas en présence de ces

concentrations. Elle commence à proliférer à partir du puits **11**, qui correspond à une concentration de **0.05g/L** de Cu (50 mg Cu/L).

➤ **Le cadmium**

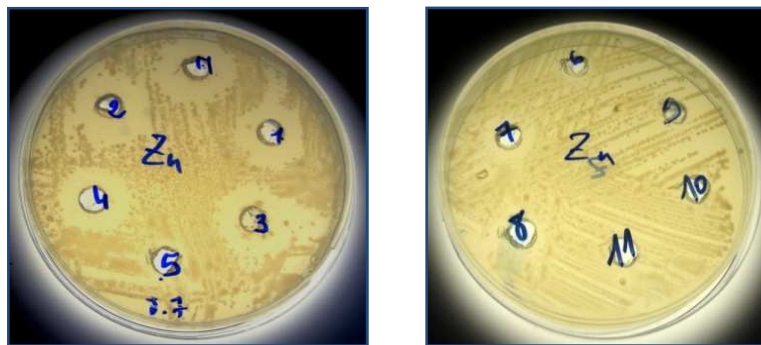


**Figure 7.** Effet de concentrations croissantes en cadmium sur la croissance de *Pseudomonas putida* souche Pp01 en milieu SLP solide

(M: 10g/L - 1: 5g/L - 2: 4g/L - 3: 3g/L - 4: 2g/L - 5: 1g/L - 6: 0.5g/L - 7: 0.4g/L - 8: 0.3g/L - 9: 0.2 g/L - 10: 0.1g/L - 11: 0.05g/L)

Comme le montre la figure 7, les zones d'inhibition autour des concentrations : 10 - 5 - 4 - 3 - 2 - 1 - 0.5 - 0.4 g/L sont plus ou moins importantes. La bactérie *Pseudomonas putida* souche Pp01 ne se développe donc pas en présence de ces concentrations. Elle commence à proliférer à partir du puits **8**, correspondant à une concentration de **0.3g/L** de Cd (300 mg Cd/L).

➤ **Le zinc**



**Figure 8.** Effet de concentrations croissantes en zinc sur la croissance de *Pseudomonas putida* souche Pp01 en milieu SLP solide

(M: 10g/L - 1: 5g/L - 2: 4g/L - 3: 3g/L - 4: 2g/L - 5: 1g/L - 6: 0.5g/L - 7: 0.4g/L - 8: 0.3g/L - 9: 0.2 g/L - 10: 0.1g/L - 11: 0.05g/L)

En présence de concentrations croissantes en zinc, des zones d'inhibition plus ou moins importantes apparaissent autour des concentrations: 10 - 5 - 4 - 3 - 2 - 1 - 0.5 - 0.4 - 0.3 g/L. Ceci nous permet de dire que *Pseudomonas putida* souche Pp01 ne prolifère pas en présence de ces concentrations. Elle se développe à partir du puits **9** correspondant à une concentration de **0.2g/L** de Zn (200 mg Zn/L).

### II.1.2. *Burkholderia fungorum* souche Bf01

#### ➤ Le cuivre



**Figure 9.** Effet de concentrations croissantes en cuivre sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP solide

(M: 10g/L- 1: 5g/L - 2: 4g/L - 3: 3g/L - 4: 2g/L - 5: 1g/L - 6: 0.5g/L - 7: 0.4g/L - 8: 0.3g/L - 9: 0.2 g/L - 10: 0.1g/L - 11: 0.05g/L)

La figure 9 indique des zones d'inhibition importantes pour les concentrations : 10 - 5 - 4 - 3 - 2 - 1 - 0.5 - 0.4 - 0.3 - 0.2 g/L donc *Burkholderia fungorum* souche Bf01 ne se développe pas en présence de ces concentrations. Elle commence à proliférer à partir du puits 10 correspondant à la concentration **0.1 g/L** de Cu (100 mg Cu/L).

#### ➤ Le cadmium

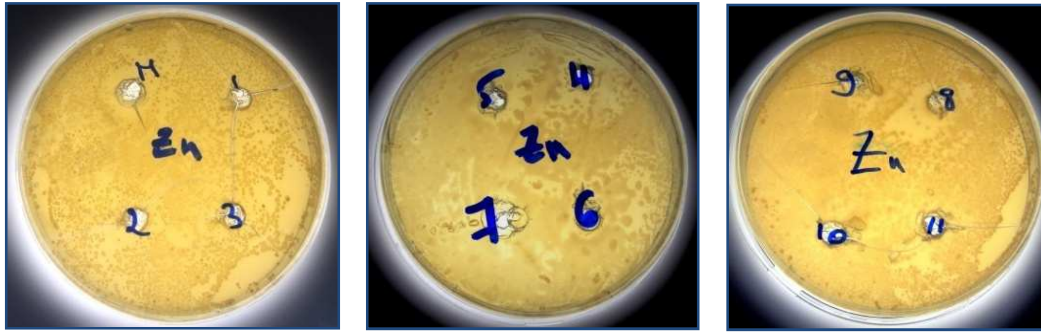


**Figure 10.** Effet de concentrations croissantes en Cadmium sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP solide

(M: 10g/L- 1: 5g/L - 2: 4g/L - 3: 3g/L - 4: 2g/L - 5: 1g/L - 6: 0.5g/L - 7: 0.4g/L - 8: 0.3g/L - 9: 0.2 g/L - 10: 0.1g/L - 11: 0.05g/L)

La figure 10 montre des zones d'inhibition importantes pour les concentrations : 10 - 5 - 4 - 3 - 2g/L, *Burkholderia fungorum* souche Bf01 commence à se développer à partir de la concentration **de 1g/L** de Cd (1000 mg Cd/L), correspondant au puits **5**.

➤ **Le zinc**



**Figure 11.** Effet de concentrations croissantes en zinc sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP solide  
(M: 10g/L - 1: 5g/L - 2: 4g/L - 3: 3g/L - 4: 2g/L - 5: 1g/L - 6: 0.5g/L - 7: 0.4g/L - 8: 0.3g/L - 9: 0.2 g/L - 10: 0.1g/L - 11: 0.05g/L)

Les zones d'inhibition autour des concentrations : 10 - 5 - 4 - 3 - 2 - 1 - 0.5 g/L (Fig.11), indiquent que *Burkholderia fungorum* souche Bf01 ne se développe pas en présence de ces concentrations. Elle commence à se développer à partir de la concentration de **0.4g/L** de Zn (400 mgZn/L).

### II.1.3. Conclusion

Les concentrations minimales inhibitrices (MIC) de chacune des souches pour ces trois métaux sont mentionnées dans le **tableau V**.

**Tableau V :** Concentrations minimales inhibitrices des deux bactéries (*Burkholderia fungorum* Bf01 et *Pseudomonas putida* Pp01) sur milieu solide SLP.

Bactérie	Cuivre	Cadmium	Zinc
<i>Pseudomona putida</i> souche Pp01	50-100 mg/L	300-400 mg/L	200-300 mg/L
<i>Burkholderia fungorum</i> souche Bf01	50-100 mg/L	>1000mg/L	400-500 mg/L

D'après les résultats notés dans le tableau V, nous pouvons affirmer que le degré de toxicité des métaux lourds étudiés vis-à-vis des deux souches bactériennes est établi comme suit :

- Pour *Burkholderia fungorum* souche Bf01: **Cu > Zn > Cd**
- Pour *Pseudomonas putida* souche Pp01: **Cu > Zn > Cd**

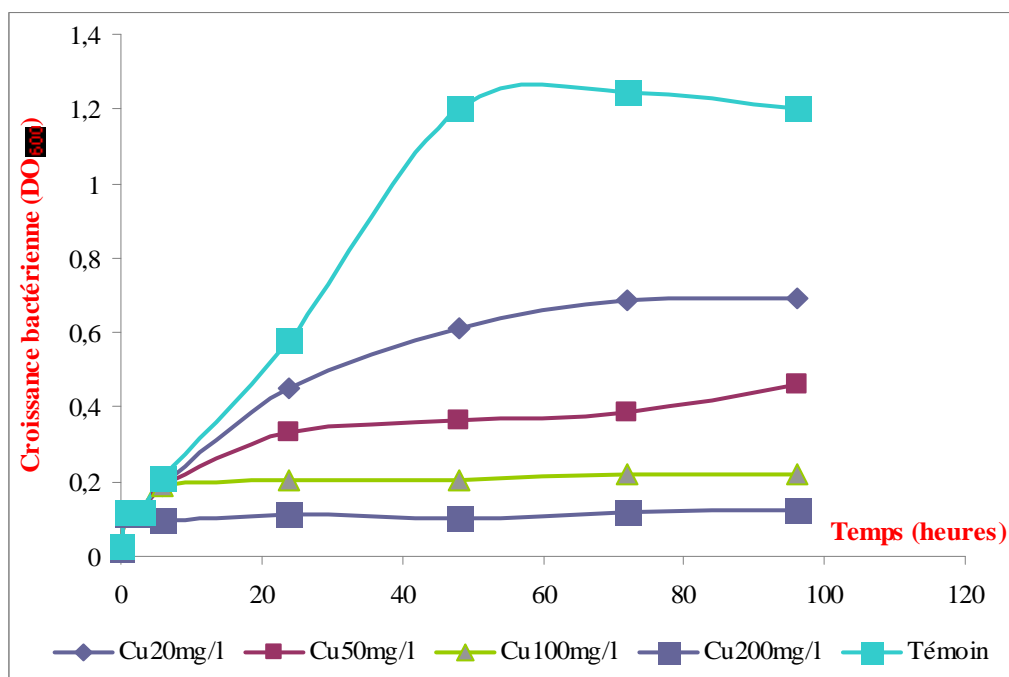
Selon les concentrations minimales inhibitrices, les deux bactéries étudiées ont montré une résistance importante vis à vis des trois métaux. La bactérie *Burkholderia fungorum* souche Bf01 a cependant montré une meilleure tolérance aux trois métaux, surtout vis-à-vis du cadmium et du zinc. C'est pour cette raison que la souche Bf01 est retenue pour la suite du travail, particulièrement les expérimentations relatives à la bioremédiation par la rétention des métaux lourds.

## II.2. La CMI de *B. fungorum* souche Bf01 en milieu SLP liquide

Pour une meilleure fiabilité de ces résultats, les CMI de la souche *Burkholderia fungorum* souche Bf01, pour Cd, Zn et Cu ont été également déterminées en milieu liquide. La  $DO_{600}$  est régulièrement mesurée pour établir la cinétique de croissance de la bactérie en présence de chacun des métaux lourds, aux concentrations précédemment établies.

Les résultats obtenus sont consignés sur les figures suivantes, où nous avons noté au niveau de la phase exponentielle de croissance et en présence des trois métaux, deux étapes essentielles : l'une se situant entre 0 et 24 heures et l'autre entre 24 et 50 heures :

### ➤ Le cuivre



**Figure 12.** Effet de différentes concentrations en Cuivre (de 0.02 à 0.2 g/L) sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP liquide.

D'après les courbes de croissance, la phase de latence est très courte, voir inexistante ; elle ne dépasse pas une à deux heures, quelque soit la concentration en métal. Nous pouvons donc conclure qu'il n'y a pas de temps d'adaptation de la souche aux différentes concentrations en cuivre (Fig. 12). Malgré le développement de *B. fungorum* souche Bf01 en milieu liquide en présence de concentrations croissantes en cuivre, sa croissance est ralentie avec l'augmentation de la concentration en cuivre de 20 à 200mg/L. Le tableau VI, montre les taux de réduction de la croissance de la souche Bf01, en présence de différentes concentrations en Cu.

**Tableau VI.** Taux de réduction de la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01, en présence de différentes concentrations en cuivre

Concentrations (Cu)	20 mg/l	50mg/l	100mg/l	200mg/l
Taux de réduction à 24 h	31%	49%	69%	83%
Taux de réduction à 50 h	40%	60%	80%	90%

L'analyse du taux de réduction sur les deux étapes précédemment citées nous permet de relever que durant :

- Etape 1 (0-24 h)

Malgré le développement de *B. fungorum* souche Bf01 en milieu liquide en présence de concentrations croissantes en cuivre, sa croissance reste significativement faible, voir bien inhibée avec les concentrations 100 et 200 mg/L, où elle est réduite respectivement à 69% et 83%, elle commence à tolérer l'élément cuivre à partir de 50mg/L, où la réduction de la croissance à 24 heures est de moitié par rapport au témoin (49%).

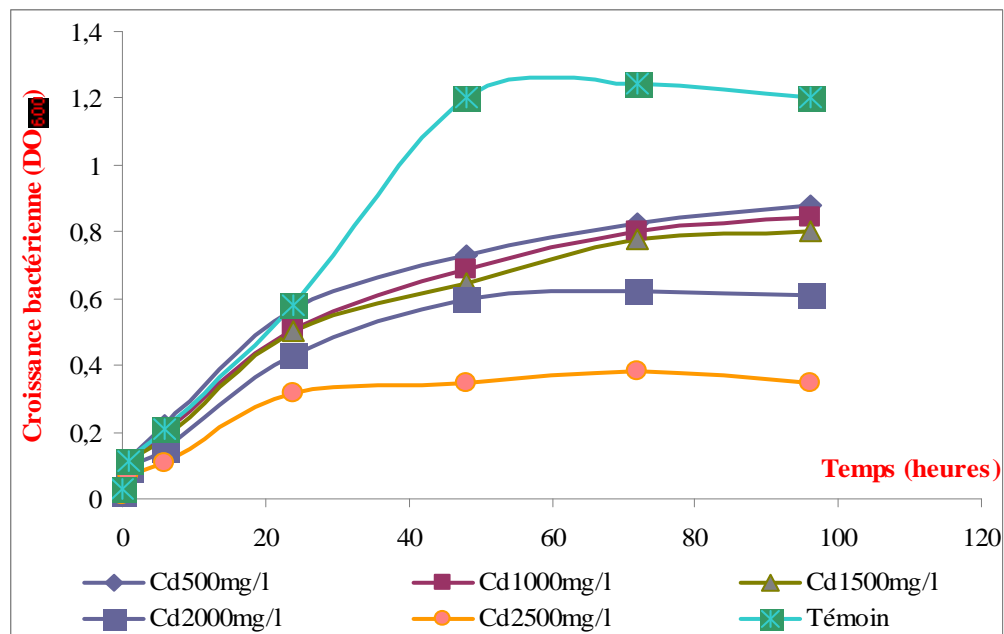
A 20mg Cu/L, la croissance n'est réduite que de 31% et elle est plus importante par rapport à celles en présence des autres concentrations.

- Etape 2 (24-50h)

A 100 et 200 mg/L, la croissance est réduite respectivement de 80% et 90%, elle commence à tolérer le Cu à partir de 50mg/l où le taux de réduction est de 60%.

A 20mg Cu/L, la croissance n'est réduite que de 40% et on peut dire que *B. fungorum* souche Bf01 croît assez bien en présence de 20mg Cu/L et peut tolérer 50mg Cu/L.

### ➤ Le cadmium



**Figure 13.** Effet de différentes concentrations en Cd (de 0,5 à 2,5 g/L) sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP liquide sur 96 heures.

La phase de latence reste très courte, voir inexistante ; elle ne dépasse pas une heure, quelque soit la concentration en Cd. Il n'y a donc pas de temps d'adaptation de la souche aux différentes concentrations en cadmium (Fig. 13). La croissance de *B. fungorum* souche Bf01 en milieu liquide est inversement proportionnelle la concentration du cadmium de 500 et 2500 mg/L. Les taux de réduction de la croissance de la souche Bf01 en présence de différentes concentrations en Cd sont mentionnés dans le tableau VII.

**Tableau VII.** Taux de réduction de la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01, en présence de différentes concentrations en cadmium

Concentrations (Cd)	500 mg/l	1000 mg/l	1500 mg/l	2000 mg/l	2500 mg/l
Taux de réduction à 25 h	10%	21%	23%	34%	51%
Taux de réduction à 50 h	35%	43%	46%	50%	71%

L'analyse des taux de réduction sur les étapes 1 et 2 nous permet de relever:

- Etape 1 (0-24h)

A une concentration de 2500 mg Cd/L, la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 est assez importante avec un taux de réduction qui n'est que de moitié (51%). Il s'agit de concentration la plus importante. A des concentrations plus faibles,

1000 et 1500mgCd/L, la réduction du taux de croissance n'est que de respectivement de 21 et 23%.

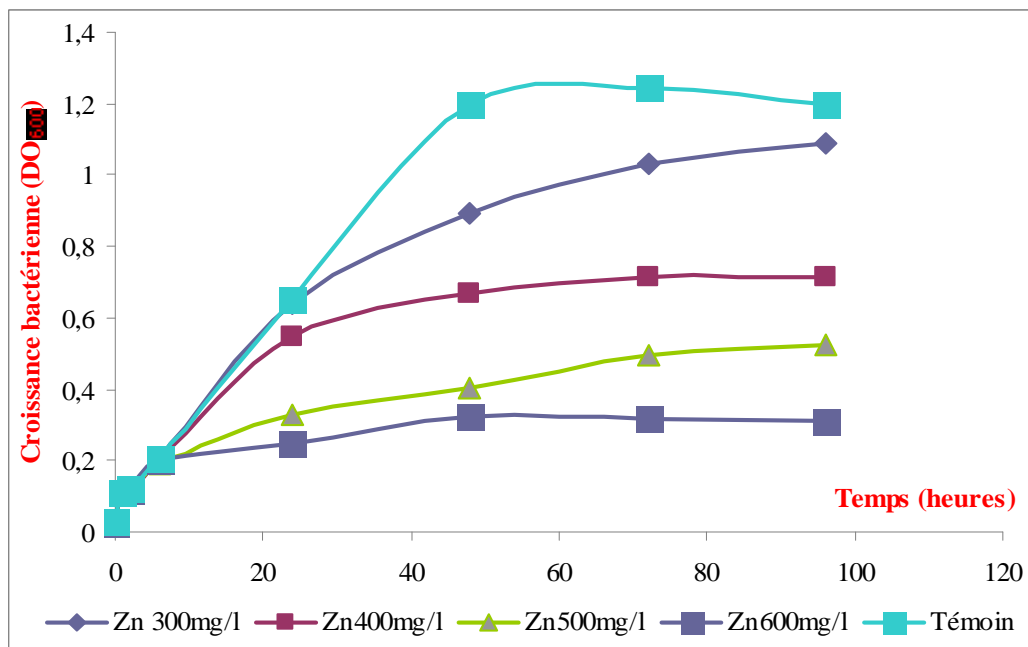
- Etape 2 (24-50h)

En présence de concentrations élevées en cadmium 2000 mg Cd/L et 2500 mg Cd/L la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 est réduite respectivement de 50% et 71%.

A 1000 et 1500 mg Cd/L, le taux de croissance n'est réduit que respectivement de 43% et 46% par rapport au témoin. La densité bactérienne reste relativement importante, si nous la comparons aux concentrations plus fortes (2000 et 2500mgCd/L).

A 500mgCd/L, la croissance n'est pas significativement réduite (35%) et la densité bactérienne est importante.

➤ **Le zinc**



**Figure 14.** Effet de différentes concentrations en zinc (de 0.3 à 0.6 g/L) sur la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en milieu SLP liquide

D'après les courbes de croissance, la phase de latence reste courte et ne dépasse pas une à deux heures, quelque soit la concentration en métal. Nous pouvons donc conclure qu'il n'y a pas de temps d'adaptation de la souche aux différentes concentrations en zinc (Fig. 14). La croissance de la souche Bf01 en milieu liquide est ralentie avec l'augmentation de la concentration en zinc entre 300 et 600mg/L. Les taux de réduction de la croissance de la souche Bf01 en présence de différentes concentrations en Zn sont illustrés dans le tableau VIII.

**Tableau VIII.** Taux de réduction de la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01, en présence de différentes concentrations en Zinc.

Concentrations (Zn)	300 mg/l	400mg/l	500mg/l	600mg/l
Taux de réduction à 25 h	1.7%	15%	50%	>61%
Taux de réduction à 50 h	24%	43%	66%	74%

- Etape 1 (0-24 h)

A une concentration de 500mg/L en Zinc, le taux de réduction de la croissance de la souche Bf01 est de 50% ; au delà et à une concentration de 600 mg Zn/L, cette réduction est estimée à plus de 61%. A 400mg Zn/L, le taux de croissance n'est réduit que de 15.4% par rapport au témoin et la croissance est presque aussi importante que le témoin.

A 300mgZn/L, la réduction de la croissance est négligeable (1.7%). Nous pouvons donc conclure que les concentrations de 300 et 400mg de Zn/L ne semblent pas affecter la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01. (Fig.14)

- Etape 2 (24-50 h)

A une concentration de en zinc de 500mg/L, le taux de réduction de la croissance de la souche Bf01 est de 66% ; au delà et à une concentration de 600 mg Zn/L, cette réduction est estimée à plus de 74%.

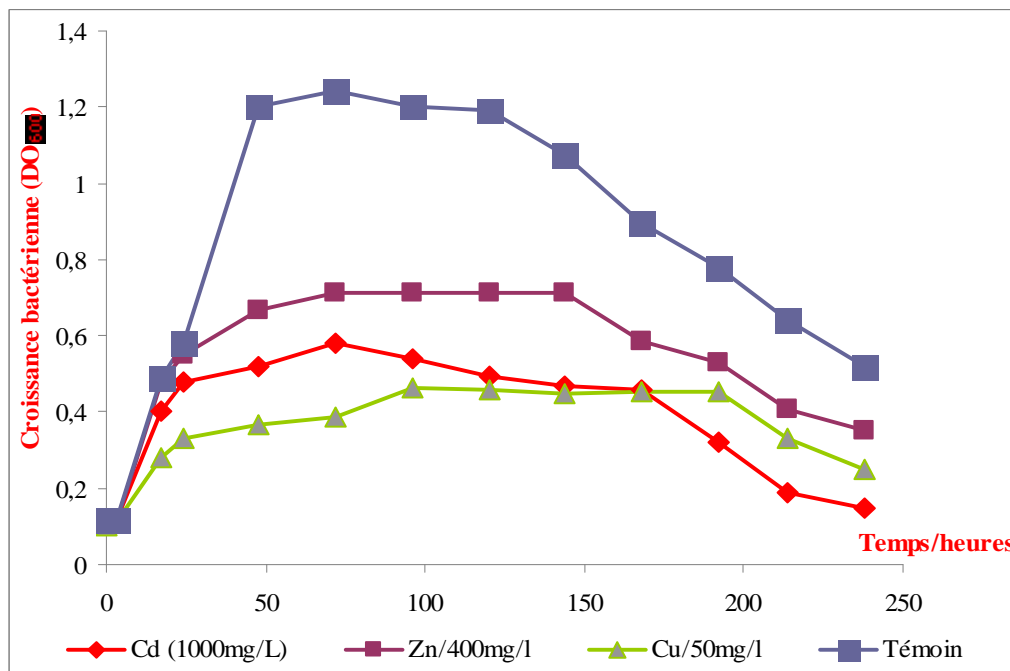
A 400mg Zn/L, le taux de croissance n'est réduit que de 43% par rapport au témoin et la densité bactérienne reste assez importante, si nous la comparons aux concentrations plus fortes (500 et 600 mg Zn/L). Nous pouvons donc admettre que la souche bactérienne *Burkholderia fungorum* souche Bf01 tolère cette concentration en zinc (400mg Zn/L).

### II.2.1. Conclusion

De ces différentes expérimentations, nous pouvons conclure, que les Concentrations Minimales Inhibitrices de *B. fungorum* souche Bf01 sont comprises entre 400 et 500 mg/L, 50 et 100 mg/L et 1500 et 2000 mg/L, respectivement pour le zinc, le cuivre et le cadmium. Ceci confirme les résultats de l'étude des MIC sur milieu solide.

Par ailleurs, ces résultats indiquent une meilleure tolérance de la bactérie *B. fungorum* du cadmium, suivi du zinc et du cuivre.

### II.3. Comparaison des cinétiques de croissance de *B. fungorum* souche Bf01 en présence des métaux lourds (Cd, Zn et Cu) aux seuils de tolérance



**Figure 15.** Cinétiques de croissance comparées de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en présence des métaux lourds (Cd, Zn et Cu) aux seuils de tolérance.

L'addition des métaux lourds à des concentrations relativement élevées (Cd-1g/L, Zn-400mg/L et Cu-50mg/L) a engendré une réduction significative de la croissance de *Burkholderia fungorum* souche Bf01. Après 50 heures de croissance, la production de biomasse cellulaire est réduite de près de 4 fois en présence de 50 mg/L de cuivre, de 2,4 fois pour 1 g/L de cadmium et de 2 fois en présence de 400 mg/L de zinc. Nous pouvons également noter que malgré cette réduction importante de la croissance de *B. fungorum* en présence des métaux lourds ci-dessus mentionnés ; le potentiel bactérien après 50 heures de culture reste à un niveau appréciable (Fig. 15).

L'ordre de toxicité de cette souche pour ces trois métaux, est donné comme suite :

Cuivre > Zinc > Cadmium

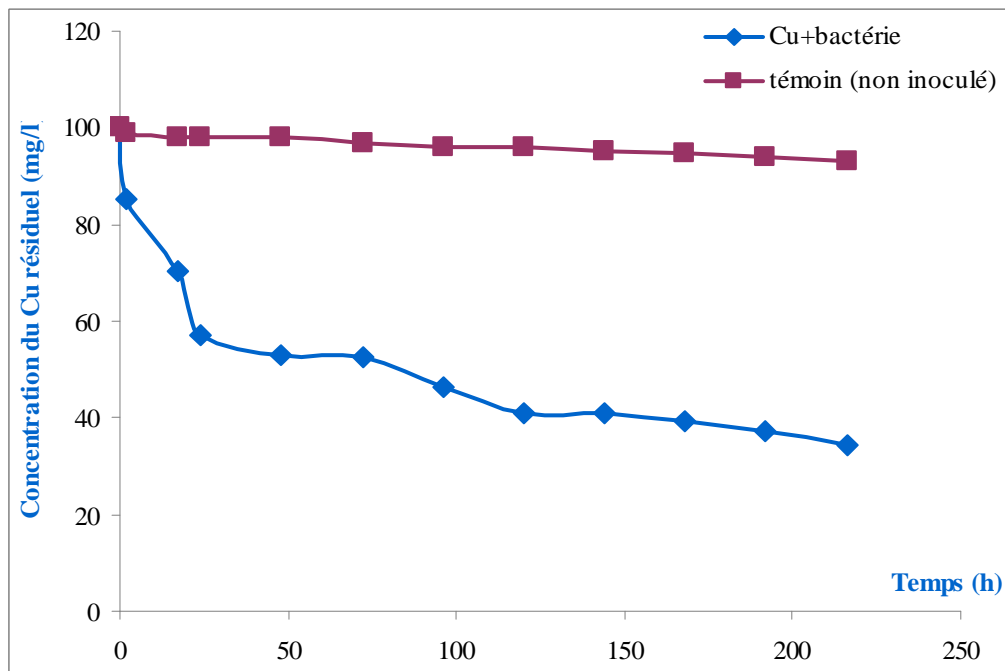
#### II.4 Élimination du Cd, Zn et Cu de la solution aqueuse

Dans cette partie du travail, nous allons nous intéresser à la biorésorption des 3 métaux lourds précédemment utilisés. Pour cela, nous avons réalisé des expérimentations de cinétique d'élimination des métaux lourds pour mieux apprécier le processus de bioremédiation.

Pour les trois éléments étudiés (Cu, Zn et Cd), nous observons deux phases d'élimination distinctes :

- La première qui se situe entre 0 et 24 heures de culture, où la vitesse de réduction du métal est importante.
- La seconde phase se situe entre 24 et 120 heures, elle est caractérisée par une vitesse de réduction beaucoup plus lente.

➤ Pour le cuivre



**Figure 16.** Cinétique d'élimination du Cu dans la solution aqueuse, en présence de la bactérie *Burkholderia fungorum* souche Bf01

Une diminution importante de la concentration du Cu est notée en présence de la souche Bf01 (Fig. 16). La vitesse du processus d'élimination du Cu est ainsi évaluée, en calculant et notant

ses variations moyennes de la concentration ainsi que son taux de réduction par unité de temps (Tableau IX)

**Tableau IX.** Comparaison des taux de réduction et des vitesses d'élimination du Cu

	Taux de réduction	Vitesse d'élimination
<b>0-24 h</b>	43%	1,8 mg/L.h
<b>24-120 h</b>	15,8%	0,16 mg/L.h

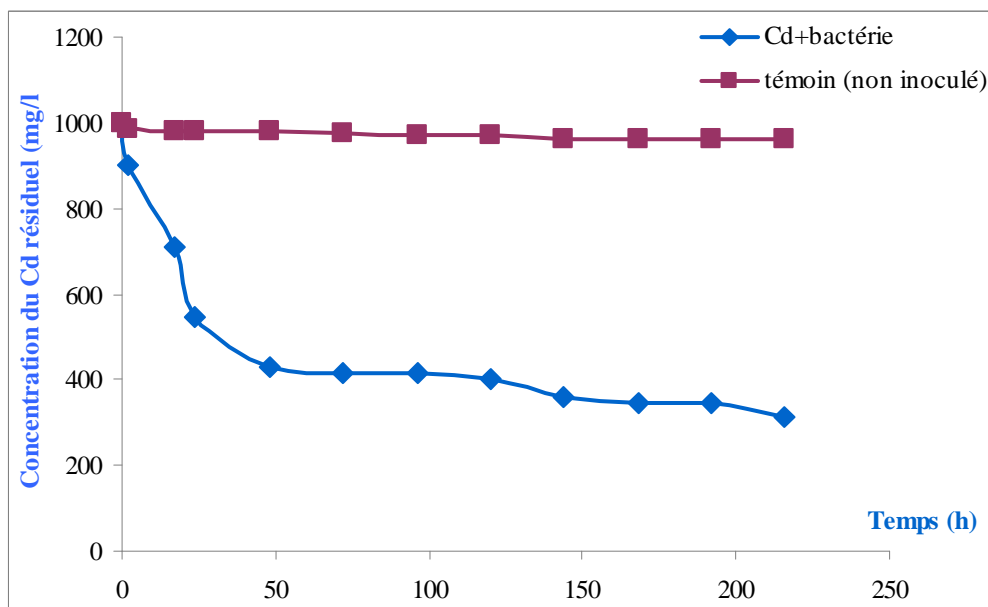
- Entre 0 et 24 heures

La vitesse de réduction du Cu est évaluée à 1.8 mg/L.h. Elle représente un taux de réduction d'environ 43% et ceci après seulement 24 heures.

- Entre 24 et 120 heures

Un taux de réduction beaucoup moins important est noté dans cette phase, il est évalué à 15,8% pendant 96 heures de culture, avec une vitesse de réduction beaucoup plus faible que celle observée précédemment (0.16 mg/L.h).

➤ *Pour le cadmium*



**Figure 17.** Cinétique d'élimination du Cd dans la solution aqueuse, en présence de la bactérie *Burkholderia fungorum* souche Bf01

En présence de la bactérie *Burkholderia fungorum* souche Bf01, une diminution importante de la concentration du Cd est enregistrée (Fig. 17). Pour évaluer la vitesse du processus d'élimination du Cd, la variation moyenne de la concentration en cadmium ainsi que son taux de réduction par unité de temps, sont calculés et donnés dans le tableau X.

**Tableau X.** Comparaison des taux de réduction et des vitesses d'élimination du Cd au niveau des 2 phases (0-24h et 24-120h)

	Taux de réduction	Vitesse d'élimination
<b>0-24 h</b>	57%	18.91 mg/L.h
<b>24-120 h</b>	26.71%	1.55 mg/L.h

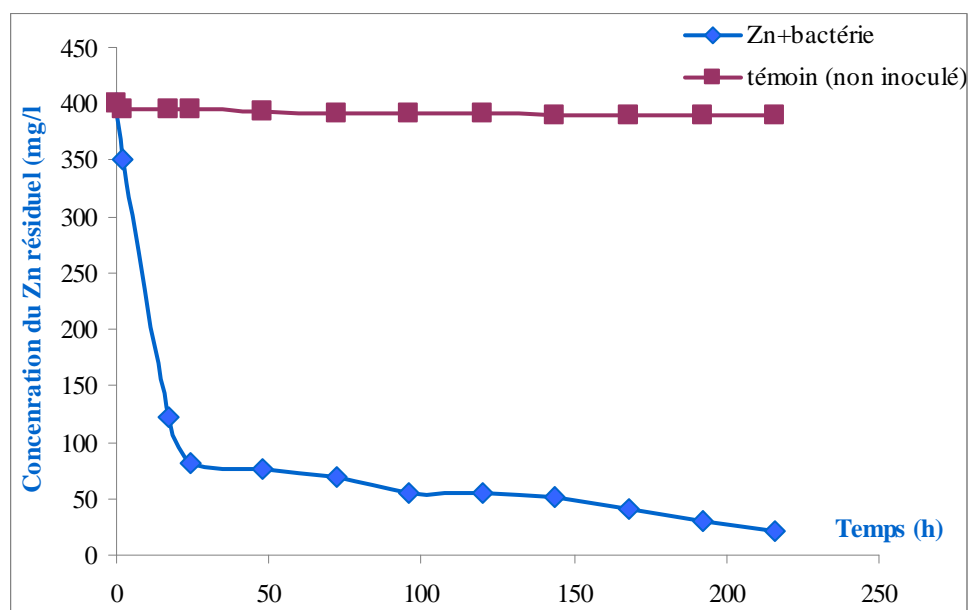
- Entre 0 et 24 heures

En présence de la bactérie *Burkholderia fungorum* souche Bf01, une diminution importante de la concentration du Cd est enregistrée et la variation moyenne de la concentration est évaluée à 18.91 mg/L.h. (vitesse d'élimination) qui correspond à un taux de réduction du Cd dans l'eau assez élevé, estimé à 57%.

- Entre 24 et 120 heures

La vitesse de la réduction de la concentration est évaluée à 1.55 mg/L.h, (variation moyenne de la concentration) qui représente un taux de réduction du cadmium dans l'eau évalué à 26.71%.

➤ *Pour le zinc*



**Figure 18.** Cinétique d'élimination du Zn dans la solution aqueuse, en présence de la bactérie *Burkholderia fungorum* souche Bf01

Une diminution très importante de la concentration du zinc est notée en présence de la souche Bf01 (Fig. 18). La vitesse moyenne de l'élimination du Zn est également évaluée en calculant les variations moyennes de la concentration en zinc ainsi que son taux de réduction par unité dans le tableau XI.

**Tableau XI.** Comparaison des taux de réduction et des vitesses d'élimination du Zn au niveau des 2 phases (0-24h et 24-120h)

	Taux de réduction	Vitesse d'élimination
<b>0-24 h</b>	79,7%	13.27 mg/L.h
<b>24-120 h</b>	33.08%	0.27 mg/L.h

- Entre 0 et 24 heures

La figure 18 montre une diminution très rapide de la concentration du Zn à seulement 24 heures de contact (13.27 mg/L.h) et le taux de réduction est estimé à 79,7%. Il est beaucoup plus important que celui observé en présence du cadmium.

- Entre 24 et 120 heures

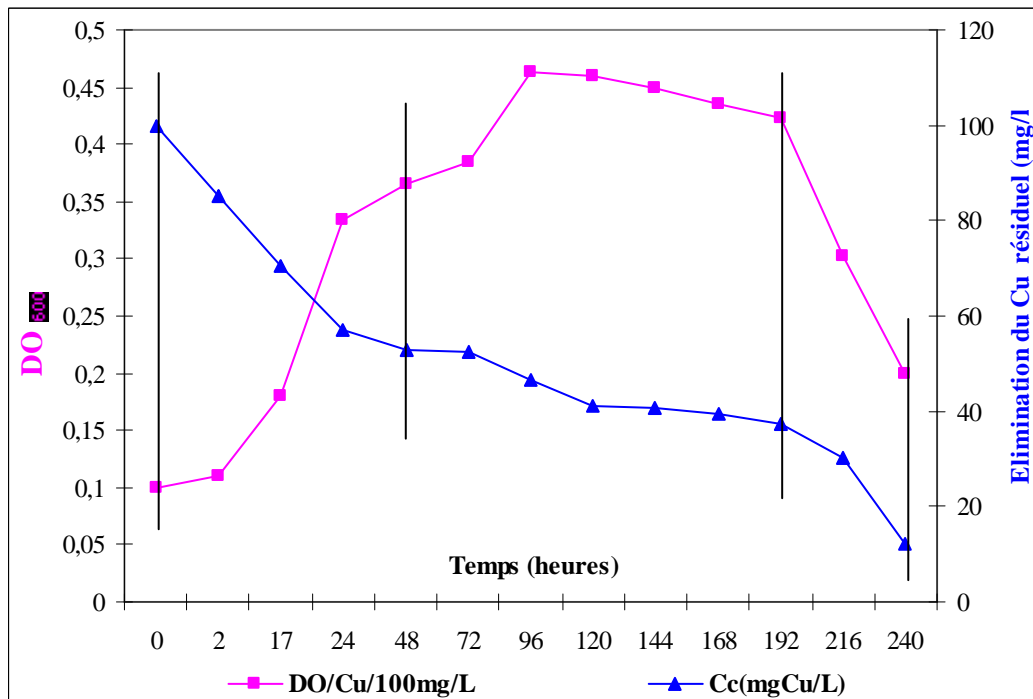
La vitesse de réduction de la concentration du zinc est beaucoup plus lente que celle notée de 0-24 heures, elle évaluée à 0.27 mg/L.h, qui représente un taux de réduction moins important estimé à seulement 33.08%.

## II.5. Cinétique de biorésorption comparée à la croissance de *B. fungorum* souche Bf01

La cinétique de réduction des métaux lourds comporte globalement 3 phases distinctes:

- Phase 1 : entre 0 et 48 heures, correspondant à la phase active de réduction de l'élément ML et à la phase exponentielle de croissance.
- Phase 2 : entre 48 et 192 heures, qui correspond à la phase stationnaire de croissance où la vitesse de réduction est plus lente « ralentissement » et.
- Phase 3 : entre 192 et 240 heures, correspond à une phase de reprise de la biorésorption et à la phase de déclin (croissance).

## ➤ Pour le cuivre



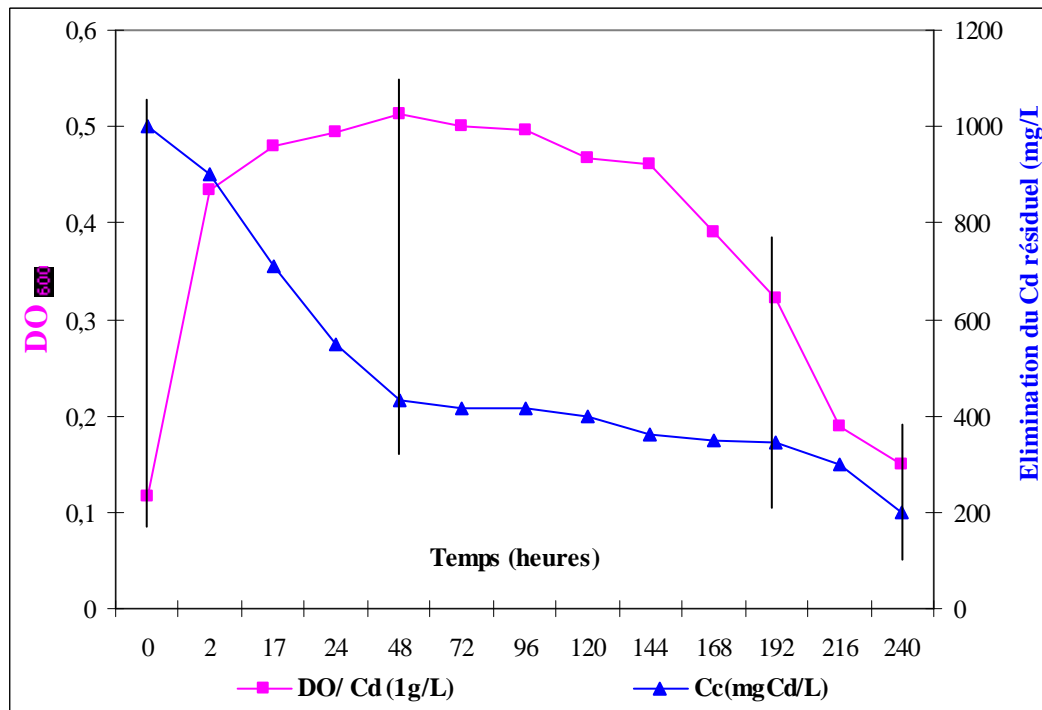
**Figure 19.** Cinétique de biorésorption du Cu (100mg/l) et croissance de *B. fungorum* souche Bf01

L'élimination du Cu débute dès la première heure de contact, avec une vitesse de réduction de 0.98mg/L.h. Entre 0-48 heures, une chute considérable de la concentration en cuivre est notée, qui correspond à 47% de réduction. .

Entre 48 et 192h ; une élimination lente et presque constante du métal (0.1mg/L.h), avec une croissance bactérienne constante d'une vitesse presque nulle (0.0004DO/h) correspondant à la phase stationnaire.

Entre 192 et 240 heures ; une reprise légèrement plus rapide de l'élimination du cuivre (0.51mg/L.h) est notée. Cette réduction atteint approximativement les 97%, avec une approche d'une élimination complète après 9 jours d'inoculation. (Fig.19)

## ➤ Pour le cadmium



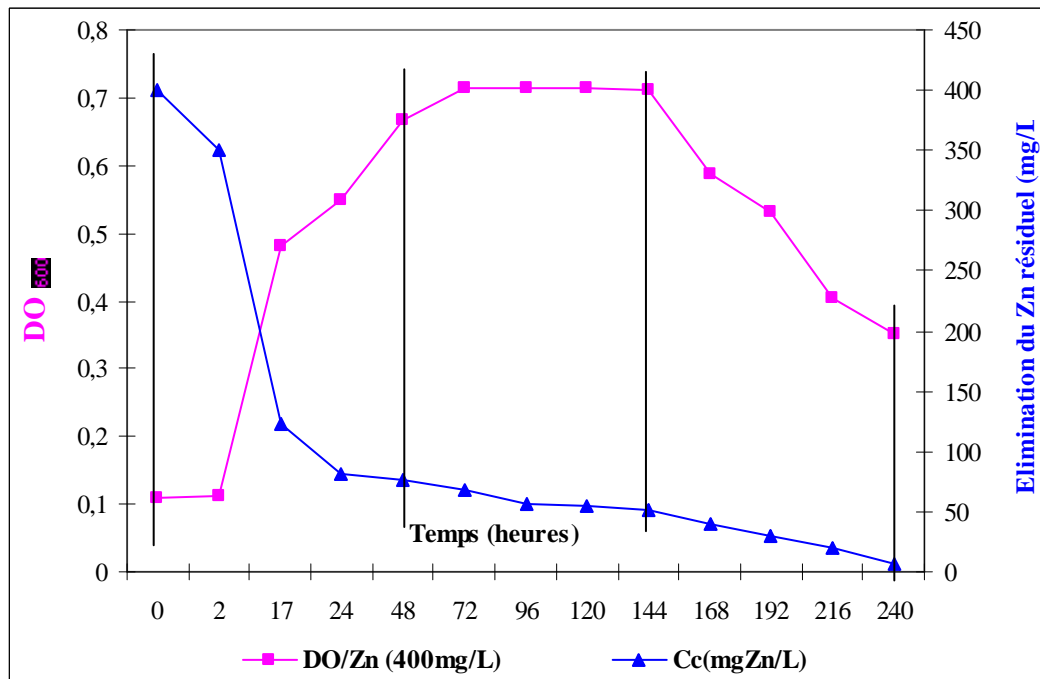
**Figure 20.** Cinétique de biorésorption du Cd (1000mg/l) et croissance de *B. fungorum* souche Bf01

Entre 0-48 ; l'élimination du Cd a également commencé dès la première heure de contact de la bactérie avec le métal, avec une vitesse moyenne de réduction de 11.84 mg/L.h et une vitesse moyenne d'augmentation de la densité bactérienne de 0.008DO/h.

Entre 48 et 192 heures ; une majorité d'élimination est notée, avec une vitesse de réduction moins importante et presque constante du Cd, évaluée à 0.6 mg/L.h.

Entre 192 et 240 heures ; une reprise plus rapide d'élimination est notée (3.03mg/L.h) pour atteindre approximativement les 80%, avec une approche d'une élimination complète après 9 jours d'incubation.

## ➤ Pour le zinc

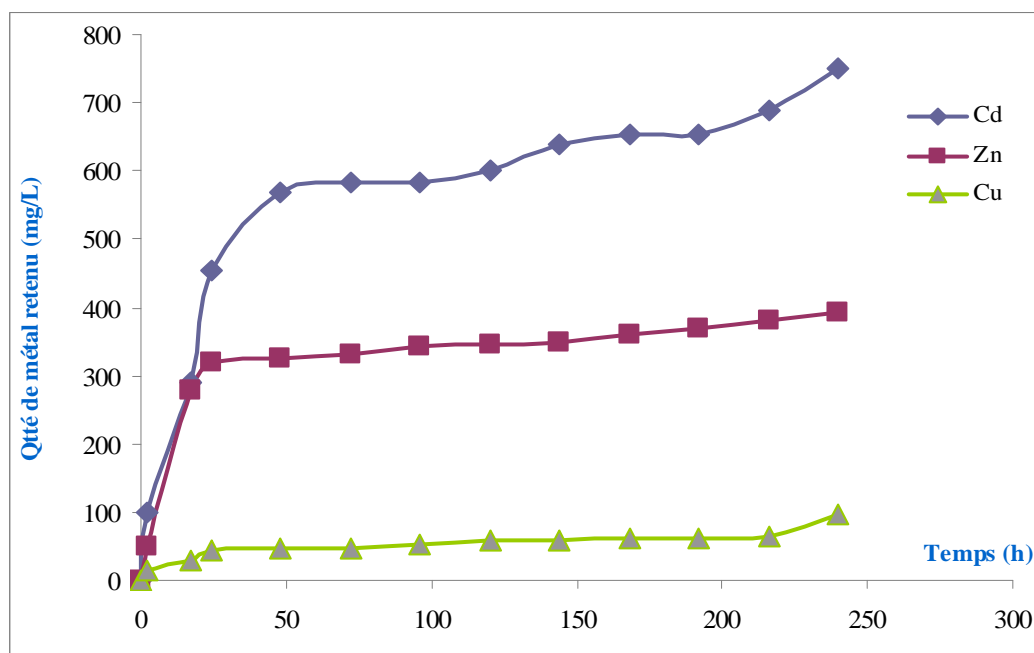


**Figure 21.** Cinétique de biorésorption du Zn (400mg/l) et croissance de *B. fungorum* souche Bf01

Entre 0-48 ; une chute considérable de la concentration du Zn et une majorité d'élimination sont établies, avec une vitesse moyenne de réduction évaluée à 6.74mg/L.h et une vitesse moyenne de croissance bactérienne de 0.0011DO/h.

Entre 48 et 240 heures ; une élimination plus lente (0.36mg/L.h) est notée. Elle atteint approximativement les 98% avec une approche d'une élimination complète après 9 jours d'inoculation.

L'étude de la rétention du métal par la bactérie, peut également expliquer le taux de son élimination du milieu (Fig. 22).

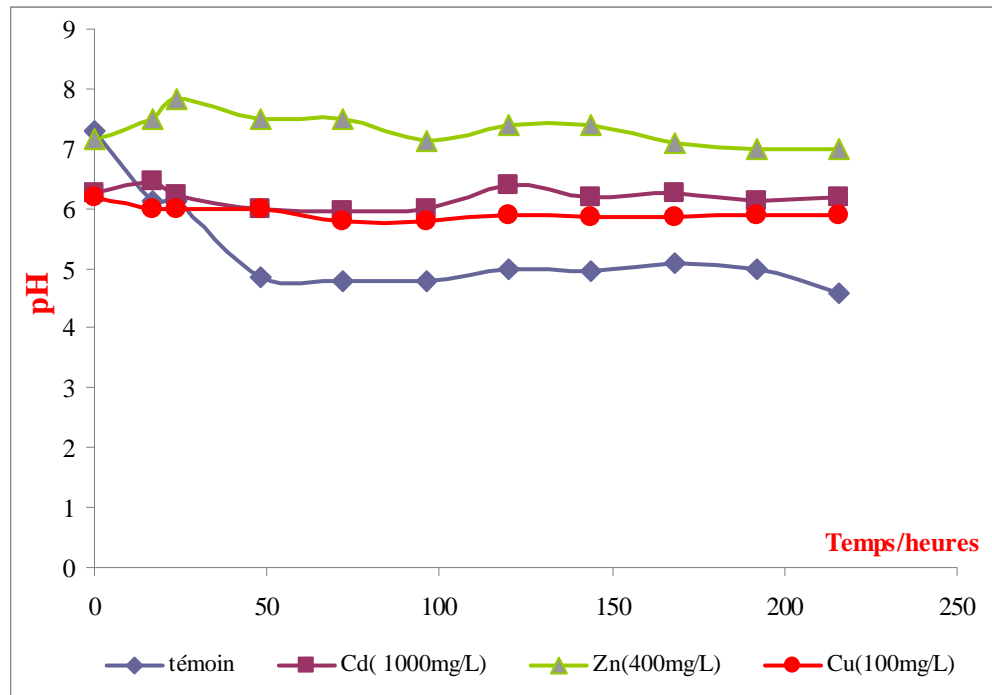


**Figure 22.** Rendement du processus de bioremédiation du Cu (100mg/l), Cd (1000mg/l) et Zn (400mg/l)

Le taux du métal retenu augmente dès les premières heures de l'inoculation et accroît significativement pendant les 50 premières heures de la croissance, ce qui correspond à la phase active de croissance), pour les trois métaux. Il atteint approximativement les 80%, 98% et 97 % respectivement pour le Cd, le Zn et le Cu, le 10<sup>ème</sup> jour.

## II.6. Suivi du pH

En absence de métaux lourds, la souche bactérienne Bf01a tendance à acidifier le milieu, cependant, en présence des métaux (Cd, Cu et Zn), le pH varie très peu et reste voisin de la neutralité. Ces conditions de pH demeurent favorables au bon déroulement du processus d'élimination des métaux par *B. fungorum* (Vijayaraghavan et Yeoung-Sang Yun, 2008).



**Figure 23.** Evolution du pH du milieu lors de l'expérimentation de biorésorption avec la bactérie *B. fungorum* souche Bf01 en présence et en absence de métaux.

## II.7. Conclusion

L'élimination des métaux lourds par *B. fungorum* souche Bf01, commence pendant la phase exponentielle de croissance (phase active) et même dès les premières heures de contact de la bactérie avec le métal. La majorité ou presque la totalité de l'élimination (pour Zn et Cu) est réalisée pendant, ou juste après la phase active de croissance (pour le Cd). Elle est très importante en présence du Cd, puisqu'elle atteint approximativement un rendement d'élimination de 80%, elle est plus importante pour le Cu et le Zn et est estimée à près de 90% (élimination presque totale), après seulement 9 jours de culture. La réduction du Cd, Zn et Cu en condition d'inoculation par la souche Bf01, suggère que l'élimination des métaux est réalisée par le biais de la bactérie elle-même, probablement par l'intermédiaire de deux processus complémentaires :

- Bioaccumulation, processus qui se réaliserait surtout pendant la phase exponentielle de croissance (Sinha et Mukherjee, 2009).
- Bioadsorption, pendant les phases stationnaires et déclin (Clifford *et al.*, 1997).

En effet, une dépendance de la densité cellulaire sur la réduction des métaux est notée pendant la phase active de croissance. Toutefois, une élimination régulière et constante des métaux pendant la phase stationnaire est également relevée et jugée indépendante de la croissance des

cellules, ce qui nous pousse à penser que c'est probablement l'EPS (métabolite secondaire), sécrété par *B. fungorum* souche Bf01 considérée comme bonne productrice d'exopolysaccharides, qui est responsable de la biorésorption. Cette production d'EPS est favorisée par les conditions défavorables du milieu de culture, observée pendant la phase stationnaire de croissance. Les travaux de Sinha et Mukherjee (2009), Clifford *et al.*, (1997) ou encore de Jan (1995) viennent appuyer ces affirmations. La production de tels polymères par les bactéries, dans ces conditions hostiles à la croissance, leur confère ainsi un rôle protecteur (Guezennec, 2001).

L'acidification du milieu au cours de la croissance bactérienne est liée à la production de métabolites acides principalement des acides organiques. Par ailleurs, l'activité métabolique bactérienne peut aussi créer un potentiel électrique à travers la membrane plasmique, appelé « gradient de protons ». Au cours du métabolisme aérobie, les protons sont « pompés » à travers la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule dans l'espace périplasmique et des électrons ou des espèces chargés négativement tels que les OH<sup>-</sup> sont concentrés à l'intérieur de la cellule (Untereiner *et al.*, 2008). Ce qui peut signifier que pendant la croissance de *B. fungorum* souche Bf01 en absence des métaux, la surface cellulaire devient chargée de plus en plus positivement, ce qui abaisse du pH.

Avec l'apport du métal, le pH diminue subitement dans le milieu, ce qui aurait été défavorable pour la rétention des métaux. A pH faible, la paroi bactérienne est protonnée, donc peu ou pas d'adsorption de métal. Quand le pH augmente, les groupes fonctionnels de surface « déprotonent » successivement, ce qui entraîne la charge négative globale sur la paroi cellulaire et une augmentation du nombre de sites disponibles pour l'adsorption du métal (Kelly, 2006). L'ajout du NaOH était donc primordial pour le retour à la neutralité ce qui est favorable au pouvoir de rétention des métaux de *B. fungorum* souche Bf01.

Le maintien de la neutralité dans le milieu en présence des métaux, peut s'expliquer par deux hypothèses :

- Avec l'ajout du NaOH pour le retour à la neutralité, un déséquilibre et une perturbation du positionnement des différents éléments chimiques de la paroi est très rapidement établi, et donc libération des protons H<sup>+</sup>, pour être remplacés par les cations métalliques, le milieu est resté donc moins acide une fois la bioremédiation installée.
- La stabilité du pH en présence des métaux (après les avoir ajusté), peut être expliquée également par le fait que *B. fungorum* souche Bf01 étant une bactérie productrice

d'EPS, capables d'interagir avec les métaux, agissent de ce fait en tant que polyanions portant une charge négative des contre-ions dont les métaux lourds (Beech et cheung, 1995), ou encore utiliser leur fraction protéique dans la complexation des métaux (Garrido *et al.*, 2002), ce qui suggère que la rétention des métaux dans notre cas peut être un processus indépendant des groupements fonctionnels de la paroi bactérienne, mais plutôt lié aux exopolysaccharides que *B. fungorum* souche Bf 01 a probablement sécrété.

Donc nous en concluons, que *B. fungorum* souche Bf01 a pu éliminer dès la première heure de contact, presque la totalité des trois métaux jusqu'à 90% au bout de 9 jours d'incubation. Une réduction n'ayant pas changé le pH du milieu, pouvait être due soit à un processus dépendant des groupements fonctionnels de la paroi bactérienne, ou indépendant lié aux EPS que la bactérie a probablement sécrété, ou encore des deux processus ensemble (Jun-Hui et Hang, 2012).

## CONCLUSION GENERALE

L'utilisation industrielle accrue des métaux et des produits chimiques entraîne une augmentation alarmante des concentrations de métaux dans l'environnement. Contrairement aux contaminants organiques, les métaux lourds ne sont pas biodégradables et ont tendance à s'accumuler dans les organismes vivants et de nombreux de leurs ions sont connus pour être toxiques ou cancérigènes, même à très faibles concentrations. Parmi les métaux lourds toxiques à inquiétude particulière dans le traitement des eaux usées industrielles, on site ; le zinc, le cuivre, le nickel, le mercure, le cadmium, le plomb et le chrome.

Par conséquent, l'élimination de ces métaux lourds toxiques à un niveau de danger pour l'environnement de manière rentable et écologique, est donc d'une grande importance. Le traitement biologique, basé sur des micro-organismes vivants, comme nous le présentons dans ce travail, offre la réduction des concentrations des métaux toxiques aux limites de l'acceptable pour l'environnement d'une manière rentable et écologique.

L'objectif général de ce travail était d'étudier le comportement de deux bactéries rhizosphériques : *B. fungorum* souche Bf01 et *P. putida* souche Pp01, exposées à des concentrations croissantes en métaux lourds : Cd, Zn et Cu. Ces bactéries ont été choisies pour leurs propriétés potentiellement intéressantes pour le traitement des métaux lourds. La démarche expérimentale entreprise vise à déterminer l'impact des ces bactéries sur l'élimination de ces trois métaux.

Les deux bactéries rhizosphériques : *B. fungorum* souche Bf01 et *P. putida* souche Pp01, ont montré une forte résistance à des concentrations assez élevées en Cd, Zn et Cu en milieu solide et liquide.

Ces bactéries ont montré donc, des Concentrations Minimales Inhibitrices élevées dont : **(100 mg/L, 1000mg/L, 500 mg/L)** chez *B. fungorum* souche Bf01 et **(100 mg/L, 400 mg/L, 300 mg/L)** chez *P. putida* souche Pp01 respectivement pour le Cu, Cd et Zn, ce qui suggère une grande résistance de ces deux bactéries à de fortes concentrations en métaux lourds. Nous avons établi ainsi, que *B. fungorum* souche Bf01 est la plus résistante des deux souches ; elle a été par conséquent utilisée pour la suite de l'étude sur la bioremédiation des métaux lourds. Cette souche bactérienne a présenté un potentiel élevé pour l'élimination du Cu, Cd et Zn de

## ***Conclusion***

l'eau. Nous avons montré que cette réduction des teneurs en « métaux lourds » débutait dès les premières heures de contact et se poursuivait pendant la phase active de croissance (phase exponentielle).

*B. fungorum* souche Bf01 a pu éliminer la presque totalité des trois métaux, jusqu'à 90% après 9 jours d'incubation.

Les résultats produits dans ce travail montrent que vue son efficacité, la bactérie *B. fungorum* souche Bf01 peut être considérée comme un outil biologique prometteur pour la bioremédiation des métaux lourds.

Ce premier travail sur l'utilisation de bactéries à potentiel « bioremédiateur » dans la biodépollution des eaux, laisse entrevoir des perspectives intéressantes pour l'avenir.

Ce travail pourrait donc être complété par des expérimentations validant définitivement les résultats produits dans ce travail. Par ailleurs, un travail d'optimisation des paramètres physiques et chimiques de la biorésorption permettrait d'améliorer de manière considérable les rendements.

Enfin la modélisation de tels systèmes biologiques constituerait un moyen d'adaptation à différents contextes.

- Ahluwalia SS, Goyal D. **2007**- Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*. **98**(12): 2243-57.
- Aleem A, Isar J et Malik A. **2003**- Impact of long-term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizospheric soil. *Bioresour Technol*. **86**(1):7-13
- Bachari NI, Abdellaoui A, Houma F. **2011**- Modélisation des données multisources pour l'étude de la pollution de la baie d'Alger à base d'un système d'information géographique. *Conférence Méditerranéenne Côtière et Maritime EDITION 2, TANGER, MAROC (2011)*.
- Baker AJM et Walker PL. **1989**- Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. Heavy metal tolerance in plants - Evolutionary aspects. *Shaw, A. (Eds). CRC Press: 155-177*
- Barlow PJ et Sidani SA. **1986**- Metal imbalance and hyperactivity. *Acta Pharmacol. Toxicol*. **59**(7): 458-62.
- Baryshnikova L M, Grishchenkov VG, Arinbasarov MU, Shkidchenko AN et Boronin LM. **2001**- Biodegradation of Oil Products by Individual Degrading Strains and Their Associations in Liquid Media. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **37**(6): 463-468
- Beech IB, Cheung CWS **1995**- Interactions of exopolymers produced by sulphate-reducing bacteria with metal ions. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. **35** : 59– 72.
- Beveridge TJ et Murray RGE. **1980**- Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. **141**: 876-887.
- Bhainsa KC et D'Souza SF. **2008**- Removal of copper ions by the filamentous fungus, *Rhizopus oryzae* from aqueous solution. *Bioresour. Technol*. **99**: 3829-3835.
- Biney C, Amuzu AT, Calamari D, Kaba N, Mbome IL, Naeve H, Ochumba PBO, Osibanjo O, Radegonde V et Saad MAH. **1992**- Etude des métaux lourds présents dans l'environnement aquatique Africain. *FAO Rapp. Pêches*, **471**:7–45
- Bisognano C. **2000**- Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus* : étude fonctionnelle et

mécanismes moléculaires. Thèse de doctorat en science. Thèse n° Sc. 3242. Université de Genève- Suisse

- Bisson M, Diderich R, Houeix N, Hulot C, Lacroix G, Lefevre JP, Leveque S, Magaud H, Morin A, Pepin G et Pichardi A. **2011**- Cadmium et ses dérivés. N E R I S - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques *DRC-11-117259-10308A. Version N°3.2*
- Bisson M, Houeix N, Gay G, Lacroix G, Lefevre JP, Magaud H, Migne V, Morin A et Tissot S. **2005**- Cuivre et ses dérivés INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques-*DRC-02-25590-02DF54.doc. Version N°1-5.*
- Blanco A, Sanz B, Llama MJ et Serra JL. **1998**- Reutilization of non-viable biomass of *Phormidium laminosum* for metal biosorption. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **27**: 167–174.
- Chandra RK. **1984**- Excessive intake of zinc impairs immune responses. *J. Am. Med. Assoc.* **252**: 1443.
- Chandrasekhar K, Kamala CT, Chary NS, Anjanuyulu Y, **2003**- Removal of heavy metals using plant biomass with reference to environmental control. *International Journal of Mineral Process.* **68**: 37–45.
- Chang JS, Robin L and Chung-Cheng C. **1997**- Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* pu21. *War. Res.* **31**(7): 1651-1658.
- CharacklisWG and wilderer PA. **1989**- Structure and function of biofilms. *Life Sciences Research Report* 46:369-371.
- Chen XC, Wang YP, Lin Q, Shi JY, WW X et Chen YX. **2005**- Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **46**: 101-107.
- Chun-yu J, Xia-fang S, Meng Q et Qing-ya W. **2008**- Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia sp.* from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere.* **72**(2): 157-164.
- Clifford LW, Peter C M, Scott CD, Sitsari K, John A, Baross JDK et Douglas SC. **1997**- Cadmium Removal by a New Strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. *Applied and Environmental Microbiology,* **63**(10): 4075–4078.

- Coenye T, Laevens S, Willems A, Ohlén M, Hannant W, Govan Jrw, Gillis M, Falsen E et Vandamme P. **2001**- *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *Int . J . Syst . Evol . Microbiol.* **51**: 1099-1107.
- Dameron C et Howe PD **1998**- Copper Environmental Health criteria n°200. Geneva, World Health Organization.
- Dardenne M. **2002**- Zinc and immune function. *European Journal of Clinical Nutrition* **56** (3): 20 – 23.
- David TJ, Wells FE, Sharpe TC et Gibbs AC. 1984- Low serum zinc in children with atopic eczema. *Br J Dermatol.* **111**:597-601.
- Donner E, Ryan CG, Howard DL, Zarcinas B, Scheckel KG, McGrath SP, de Jonge MD, Paterson D, Naidu R, Lombi E. **2012**- A multi-technique investigation of copper and zinc distribution, speciation and potential bioavailability in biosolids. *Environ Pollut.* **166**:57-64.
- Fenglian Fu, Wang Qi. **2011**- Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management.* **92**: 407-418.
- Fleischer M , Sarofim A F, Fassett D W, Hammond P, Shacklette H T, Nisbet I C, and Epstein S. **1974**- Environmental impact of cadmium: a review by the panel on hazardous trace substances. *Environ. Health Perspect.***7**: 253-323.
- Fraker PS, Haas SM et Luecke RW **1977**- Effect of zinc deficiency on the immune response of young adult A/J mouse. *J. Nutr.* **107**: 1889-1895.
- Frangi DR. **2006**- Heavy metal soil pollution cartography in northern France. *Science of The Total Environment.* **205** (1,7):71-79.
- Friberg L, Piscator M, Nordberg GF et Kjellstrom T. **1974**- Cadmium in the environment. 2<sup>e</sup> édition. CRC Press, Cleveland, OH
- Fritzherbert JC. **1976**- Acne vulgaris – zinc deficiency? *Med. J. Aust.* **1**:848
- Gabr RM, Hassan SHA et Shoreit AAM. **2008**- Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *International Biodeterioration & Biodegradation* **62**: 195–203.
- Gadd GM, White C et De Rome L. 1988, Heavy metal and radionuclide uptake by fungi and yeasts. In: P.R. Norris and D.P. Kelly (Editors), Biohydrometallurgy. A. Rowe, Chippenham, Wilts., UK.

- Galdes A et Vallée BL. **1983**- Categories of zinc metalloenzymes. *Metal Ions Biol. Syst.* **15**: 2.
- Garrido F, Michel C, Morin D. **2002**- Les exopolymères bactériens : synthèse bibliographique. BRGM RP-51637-Fr, 39 p.
- Ghenzet A et Belarbi F. **2007**- Isolement et caractérisation des bactéries fixatrices des métaux lourds. Mémoire de fin d'Etudes. Faculté des sciences Biologique. Option Biochimie et Microbiologie. Université d'Oran- Algérie.
- Green-Ruiz C, Rodriguez-Tirado V et Gomez-Gil B. **2008**- Cadmium and zinc removal from aqueous solutions by *Bacillus jeotgali*: pH, salinity and temperature effects. *Bioresource Technology* **99**: 3864-3870.
- Guezennec J, **2001**- Les exopolysaccharides bactériens d'origine hydrothermale : un exemple de valorisation de microorganismes extremophiles : 22-24
- Guibaud G, Comte S et al. **2005**- Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere.* **59**(5): 629-38.
- Guiqiu C, Guangming Z, Lin T, Chunyan D, Xiaoyun J, Guohe H, Hongliang L et Guoli S. **2008**- Cadmium removal from simulated wastewater to biomass byproduct of *Lentinus edodes*. *Bioresource Technology.* **99**: 7034–7040.
- Halttunen T, Collado MC, El-Nezami H, Meriluoto J et Salminen S. **2008**- Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Journal compilation. Letters in Applied Microbiology.* **46**: 160–165.
- Halttunen T, Salminen S et Tahvonen R. **2007**- Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **114**:30–35.
- Hambridge KM et Walrauens PA. **1976**- Trace elements in human health and disease. *Academic Press, New York.* **1**: 21.
- Harrison JJ et Ceri H. **2007**- Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* **5**(12): 928-38.
- Heemsbergen DA, Mc Laughlin MJ, Whatmuff M, Warne MS, Broos K, Bell M, Nash D, Barry G, Pritchard D et Penney N. **2010**- Bioavailability of zinc and copper in biosolids compared to their soluble salts. *Environ Pollut.* **158**(5): 1907-1915.

- Hiatt V et Huff JE. **1975**- The environmental impact of cadmium: an overview. *Int. J. Environ. Stud.* **7**: 277-285.
- Honstead JF et Brady DN. **1967**- The uptake and retention of  $^{32}\text{P}$  and  $^{65}\text{Zn}$  from the consumption of Columbia River fish. *Health Phys.* **13**: 455-63.
- Jan S. **1995**- Croissance et production de biolymères par *Rhizobium meliloti* M5N1: Effet de l'environnement. Thèse de doct. Amien France. 239p.
- Jansson-Charrier M, Guibal E, Surjous R et Cloirec P. **1995**- Continuous removal of uranium by biosorption onto chitosan: application to an industrial effluent. In *Biohydrometallurgical Processing*. University of Chile.
- Jiang C, Sheng X, Meng Q, Wang Q. **2008**- Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* . **72**(2):157-164.
- Jian-Zhong C, Xian-Cong T, Jun X, Tao Z et Zhi-Li L. **2005**- Biosorption of lead, cadmium and mercury by immobilized *Microcystis aeruginosa* in a column. *Process Biochemistry* **40**: 3675–3679.
- Jin-Ho J, Sedky HAH et Sang-Eun O. **2010**- Comparative study of biosorption of  $\text{Zn}^{2+}$  by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **64**: 734-741.
- Jo-Shu C, Robin L et Chung-Cheng C. **1997**- Biosorption Of Lead, Copper and Cadmium By Biomass Of *Pseudomonas Aeruginosa* Pu21. *Pergamon. War. Res.* **31**(7):1651-1658.
- Juan P. Rodríguez, M. De Marzi, S. Maruñak, Emilio L. Malchiodi, Laura C. Leiva et O. Acosta. **2006**- Rabbit IgG antibodies against Phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. *Medicina (Buenos Aires)*. **66** (6). versión On-line ISSN 1669-9106.
- Jun-hui Z et Hang Min, **2012**- Characterization of a multimetal resistant *Burkholderia fungorum* isolated from an e-waste recycling area for its potential in Cd sequestration. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**(2):371-374.
- Kabata-Pendias A et Pendias H. **2001**- Trace elements in soils and plants. *CRC Press*, London.
- Kazantzis G. **1984**- Mutagenic and carcinogenic effects of cadmium. *Toxicol. Environ. Chem.* **8**: 267-278.

- Kelly JJ. **2006**- Bacterial adsorption of aqueous heavy metals: molecular simulations and surface complexation models. Graduate Program in Civil Engineering and Geological Sciences. Notre Dame, Indiana. 112p.
- Kratochvil D et Volesky B. **1998**- Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnol.***16**: 291–300.
- Kumar AS et K Mody. **2007**- Bacterial exopolysaccharides--a perception. *J Basic Microbiol.* **47**(2): 103-17.
- Kurniawan TA, Chan GYS, Lo WH et Babel S. **2006**- Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chem. Eng. J.* **118**: 83-98
- Lazzarini M. **2007**- Effect of zinc supplementation on child mortality, *The Lancet.* **370**:1194-1195
- Ledin M, Krantz-Rülcker C et Allard B. **1996**- Zn, Cd and Hg accumulations by microorganisms. Organic and inorganic soil components in multi-compartment systems. *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 791-799.
- Lee DC, Park CJ, Yung JE, Jeong YH., **2000**- Screening of hexavalent chromium biosorbent from marine algae. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **54**: 445–448.
- Lodeiro P, Cordero B, Barriadh JL, Herrero R et deVicente MES. **2005**- Biosorption of cadmium by biomass of brown marine macroalgae. *Bioresource Technology.* **96**: 1796–1803.
- Loué A. **1993**- Microéléments en agriculture. Editions Nathan: 119- 154.
- Low KS, Lee CK, Leo AC. **1995**- Removal of metals from electroplating waste using banana pith. *Bioresource Technology.* **51**(2-3): 227–231.
- Malik A. **2004**- Metal bioremediation through growing cells. *Environ Int.* **30**: 261–78.
- Malle KG. **1992**- Zink in der Umwelt. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **20**(4): 196-204.
- Mameri N, Boudries N, Belhocine D, Lounici H, Grib H et Pauss A., **1999**- Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass. *Water Research.* **33** (6): 1347–1354.
- Mamoun M, Olivier JM. **1989**- Dynamique des populations fongiques et bactériennes de la rhizosphère des noisetiers truffiers. II: Chélation du fer et répartition taxonomique chez les *Pseudomonas* fluorescents. *Agronomie (Print) A.*, **9**(4):345-351.
- Meydani SN. et al, **2007**- Serum zinc and pneumonia in nursing home elderly. *Am J Clin Nutr.* **86**:1167–73.

- Migula N, **1894**- Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe **1**: 235–238.
- Modak JM, Natarajan KA et Saha B. **1996**- Biosorption of copper and zinc using waste *Aspergillus niger* biomass. *Miner Metall Process.* **13**:52–7.
- Muraleedharan TR et Venkobachar C. **1990**- Mechanism of Biosorption of copper (II) by *Ganoderma lucidium*. *Biotechnology & Bioengineering.* **35**: 320–325
- Namasivayam C et Kadirvelu K. **1999**- Uptake of mercury (II) from wastewater by activated carbon from unwanted agricultural solid by-product: coirpith. *Carbon* **37**: 79-84.
- Naseem R et Tahir SS. **2001**. Removal of Pb(II) from aqueous solution by using bentonite as an adsorbent. *Water Res.* **35**: 3982-3986.
- Nies DH. **1999**- Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 730-750.
- Nikolaev I A et Plakunov VK. **2007**- Biofilm- "City of microbes" or an analogue of multicellular organisms. *Mikrobiologiya* **76**(2): 149-63.
- Niu H, Xu XS et Wang JH. **1993**- Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. *Biotechnol Bioeng.* **42**: 785–7.
- Nordberg GF. **1974**- Health hazards of environmental cadmium pollution. *Ambio.* **3**: 55-66.
- Norton LK et Baskaran McKenzie T. **2004**- Biosorption de zinc à partir de solutions aqueuses par biosolides. *Adv. Environ. Res.* **8**: 629-635.
- O'Sullivan LA et Mahenthiralingam E. **2005**- Under the microscope: biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Letters in Applied Microbiology.* **41**: 8–11
- O'Dell BL. **1984**- History and status of zinc in nutrition. *Fed. Proc.* **43**(13): 2821-2.
- Oldiges H et al. **1985**- Lung carcinomas in rats after low level cadmium inhalation. Dans: Carcinogenic and mutagenic metal compounds. E. Merian et coll. (dir. de publ.). Gordon and Breach Science Publ., Londres, R.U: 409.
- OMS-IPCS. **1998**- Environmental Health Criteria n°200: copper, World Health Organisation, International Programme on chemical safety. <http://www.inchem.org/fullist.htm>.
- Oyaro N, Juddy O, Murago ENM et Gitonga E. **2007**- The contents of Pb, Cu, Zn and Cd in meat in Nairobi, Kenya. *Int. J. Food Agric. Environ.* **5**: 119-121

- Ozdemir G, Ozturk T, Ceyhan N, Isler R et Cosar T. **2003**- Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresource Technology*. **90**: 71–74.
- Ozer A, Ibrahim EH, Ozer D, Kutsul T et Caglar A. **1997**- A comparative study of the biosorption of cadmium (II) ions to *S. leibleinil* and *R. arrhizis*. *Chimica Acta Ture*. **25** (1): 63–67.
- Panak P, Hard BC, Pietzsch K, Kutschke S, Röske K, Selenska-Pobell S, Bernhard G et Nitsche H. **1998**- Bacteria from uranium mining waste pile: interactions with U (VI). *Journal of Alloys and Compounds*. **271-273** : 262-266
- Pardo R, Herguedas M, Barrado E et Vega M **2003**- Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Anal Bioanal Chem*. **376**: 26–32.
- Paulino AT, Minasse FAS, Guilherme MR, Reis AV, Muniz EC et Nozaki J. **2006**- Novel adsorbent based on silkworm chrysalides for removal of heavy metals from wastewaters. *J. Colloid Interface Sci*. **301**: 479-487.
- Pierre Roger et Vincent J. **2000**, Introduction à la bioremediation des sols, des eaux et de l'air. Université de Provence. Aix-Marseille 1 E.S.G.B.M.A - E.S.I.L. Luminy.
- Pleban PA, Numerof BS et Wirth FH. **1985**- Trace element metabolism in the fetus and neonate. *Clin. Endocrinol. Metab*. **14**:545-666
- Pohit J, Saha KC et Pal B. **1985**- Zinc status of acne vulgaris patients. *J. Appl. Nutr*. **37**: 18.
- Prasad AS et Brewer GJ, Schoemaker EB et Rabbani P. **1978**- Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. *J. Am. Med. Assoc*. **240**: 2166.
- Prasad AS. **1983**- Clinical biochemical and nutritional spectrum of zinc deficiency in human subjects: an update. *Nutr. Rev.*, **41**: 197.
- Prasad MNV et Freitas H. **2000**. Removal of toxic metals from solution by leaf, stem and root phytomass of *Quercus ilex* L. (holly oak). *Environmental Pollution* **110**: 277–283.
- Prasad MNV et Freitas HMO. **2003**- Metal hyperaccumulation in plants— biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron J Biotechnol*. **6**: 285–321.
- Priester. JH *et al.* **2012**- Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption ; *Proc Natl Acad Sci Unit States Am*, **109**(37);

- Puranik. P. et Paknikar. K.M., **1997**. Biosorption of lead and zinc from solutions using *Streptovorticillium cinnamoneun* waste biomass. *Journal of Biotechnology* **55**(2): 113–124.
- Rangsayatorn N, Pokethitiyook P, Upatham ES, Lanza GR. **2004**- Cadmium biosorption by cells of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel. *Environ. Int.* **30** (1): 57–63.
- Rubio J, Souza ML et Smith RW. **2002**- Overview of flotation as a wastewater treatment technique. *Miner. Eng.* **15**: 139-155.
- Sandstead HH et al. **2008**- Zinc deficiency in Mexican American children: influence of zinc and other micronutrients on T cells, cytokines, and anti inflammatory plasma proteins. *Am J Clin Nutr.* **88**:1067–7.
- Sandstead HH. **1985**- Zinc: essential for brain development and function. *Nutr. Rev.*, **43**: 129-37.
- Sarret G, Avoscan L, Carriere M, Collins R, Geoffroy N Carrot F, Coves J et Gouget B. **2005**- Chemical Forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 Exposed to Selenite and Selenate. *Applied and Environmental Microbiology.* **71**: 2331-2337.
- Sarret G, Balesdent J, Bouziri. L, Garnier. JM, Marcus. MA, Geoffroy. N, Panfili F. et Manceau A. **2004**- Zn speciation in the organic horizon of a contaminated soil by micro-X-ray fluorescence, micro- and powder-EXAFS spectroscopy, and isotopic dilution. *Environ Sci Technol.* **15**; **38**(10):2792-801.
- Say R, Denizli A et Arica MY. **2001**- Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology* **76**: 67–70.
- Senapati A et Thompson RPH. **1985**- Zinc deficiency and the prolonged accumulation of zinc in wounds. *Br. J. Surg.* **72**: 583.
- Sinha S et Mukherjee SK. **2009**- *Pseudomonas aeruginosa* kudc1, a possible candidate for cadmium bioremediation. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**: 655-662.
- Smith LA et Alleman BC, Copley-Graves L. **1994**- Biological treatment options. In: Means JL et Hinchee RE (Eds.), *Emerging Technology for Bioremediation of Metals*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1.

- Smith SR. **2009**- A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environ Int.***35**(1): 142-156.
- Srivastava NK et Majumder CB. **2008**- Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *J. Hazard. Mater.* **151**: 1-8
- Summers AO et Silver S. **1972**- Mercury resistance in a plasmid bearing strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **112**(3): 1228-1236.
- Tobin JM et Roux JC. **1998**- Mucor biosorbent for chromium removal from tanning effluent. *Water Research* **32** (5), 1407–1416.
- Tsekova K, Todorova D et Ganeva S. **2010**- Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration and Biodegradation.* **64**: 447-451.
- Tsezos M et Volesky B. **1982**- The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**: 385-401.
- Turnland J.R, King JC, Keyes WR, Gong B et Michel MC **1984**- A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and  $\alpha$ -cellulose. *Am. J. Clin. Nutr.*, **40**: 1071.
- U.S. Environmental Protection Agency **1976**- Quality criteria for water. Washington, DC. PB-263 943: 481.
- Untereiner G. **2008**- Etude de l'impact de bactéries environnementales sur la spéciation de l'uranium en vue de processus de bioremédiation. Thèse de Doctorat l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). France
- Valls M et Lorenzo V. **2002**- Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev.* **26**: 327-38
- Veglio F et Beolchini F. **1997**- Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* **44**: 301-316.
- Verma B et Shukla NP. **2000**- Removal of nickel (II) from electroplating industry by agrowaste carbons. *Indian Journal of Environmental Health* **42** (4), 145–150.
- Vijayaraghavan K et Yeoung-Sang Y. **2008**- Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances.* **26**: 266–291.

- Vinopal S, Ruml T et Kotrba P. **2007**- Biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> by cell surface engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **60**: 96-102.
- Volesky B et Holan ZR. **1995**- Biosorption of heavy metals. *Biotechnol Prog*; **11**:235–50.
- Volesky B, May-Phillips HA. **1995**- Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology & Biotechnology* **42**:797–806.
- Volesky B. **1990**- Biosorption and biosorbents. In: Volesky B, editor. *Biosorption of heavy metals*. Florida: CRC press: 3–5.
- Wang CL, Michels PC, Dawson SC, Kitisakkul S, Baross JA Keasling JD et Clark DS. **1997**- Cadmium Removal by a New Strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Environmental Microbiology*, **63**(10):4075–4078
- Wisniewska-Knypl JM, Jablonska J et Myslak Z **1971**- Binding of cadmium on metallothionein in man: an analysis of a fatal poisoning by cadmium iodide. *Arch Toxicol*, **28**, 46.
- Wu SC, Peng XL, Cheung KC, Liu SL et Wong MH. **2009**- Adsorption kinetics of Pb and Cd by two growth promoting rhizobacteria. *Bioresource Technology*, **100**(20): 4559-4563
- Yan-Hui L, Shuguang W, Zhaokun L, Jun D, Cailu X, Dehai W. **2003**- Adsorption of cadmium (II) from aqueous solution by surface oxidized carbon nanotubes. *Carbon* **41**(5): 1057-1062
- Zhang L, Zhao L, Yu Y, Chen C, **1998**- Removal of lead from aqueous solution by non-living *Rhizopus nigricans*. *Water Research* (**32**): 1437–1444.
- Zoller WH, **1984**- Anthropogenic perturbations of metal fluxes into the atmosphere. *Changing metal cycles and human health*, édité par J.O. Nriagu. Dahlem Konferenzen. Berlin: 27–34.

## المخلص

تمت دراسة مقاومة البكتيريا الروزوسفيرية *Pseudomonas putida* و *Burkholderia fungorum* للكاديوم، الزنك و النحاس باستخدام طريقة الأبار لنشر المعدن في الوسط SLP الصلب و مراقبة مناطق التثبيط، و من ثم إعطاء ترتيبها من التسمم للمعادن الثلاثة المدروسة، حيث كان للبكتيريا *Burkholderia fungorum Pseudomonas putida* نفس الترتيب: النحاس < الزنك < الكاديوم. بتركيزات متفاوتة (100mg/L, 400mg/L, 300mg/L) ل *P. putida* و (100mg/L, 1000mg/L, 500 mg/L) ل *B. fungorum* على التوالي Zn, Cd, و Cu. لذلك إقترض في هذا العمل أن للبكتيريا *B. fungorum* مقاومة افضل لهذه المعادن، و بالتالي تم اختيارها لدراسة ازالة المعادن. تمت متابعة حركية النمو في وسط SLP سائل يحوي المعادن بتركيز متزايدة وبالتالي تحديد التركيز الأدنى المثبط (MIC) لكل سلالة. تم تحليل المعادن المزالة من طرف *B. fungorum* بواسطة الامتصاص الذري الطيفي في السطح الطائف بعد الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة في 15000 دورة في الدقيقة، حيث اظهرت النتائج قابلية *B. fungorum* العالية لإمتصاص و ازالة الكاديوم، الزنك و النحاس. بدأت الإزالة منذ الساعات الأولى من اتصال البكتيريا مع المعدن أثناء مرحلة النمو المتسارع، مع إجراء معظم الإزالة خلال المرحلة الثابتة، و عند بلوغها الهضبة، كانت قد وصلت ما يقرب من 90% من الإزالة للمعادن الثلاثة. أظهرت السلالتين المدروستين ثم درجة عالية من المقاومة للمعادن الثلاثة، خاصة الكاديوم (معدن شديد التسمم) لدى *B. fungorum* التي تمثل أداة بيولوجية ممتازة للمعالجة البيولوجية للمعادن الثقيلة، و ذلك لوفرتها، كفاءتها و إنخفاض كلفتها.

**الكلمات المفتاحية:** المعالجة البيولوجية، الكاديوم، النحاس، الزنك، المعادن الثقيلة *Burkholderia fungorum. Pseudomonas putida*

## Abstract

The rhizospheric bacteria resistance of: *Pseudomonas putida* and *Burkholderia fungorum*, to Cd, Zn and Cu was studied using the wells metal diffusion method on SLP solid medium and inhibition zones was observed. Both strains showed a high minimum inhibitory concentrations (MIC) which (100 mg/L, 400 mg/L, 300 mg/L) with *P. putida* Pp01 strain and (100 mg/L, 1000mg/L, 500 mg/L) with *B. fungorum* Bf01 strain for Cu, Cd and Zn respectively. The same order of toxicity was therefore noted for both strains: Cu > Zn > Cd. As a result, it was assumed in this work that *B. fungorum* had better resistance to these three metals and was consequently chosen for the metal removal study. The monitoring kinetics of growth was followed in SLP liquid medium added with increasing concentrations of metals. Metals removed by *B. fungorum* was analyzed by Atomic Absorption Spectrometry in the supernatant after centrifugation for 15 min at 15000 rpm. The results showed that *B. fungorum* exhibited a high affinity for Cd, Zn and Cu removal. The elimination began dice the early hours of bacteria contact with the metal during the exponential growth phase. The removal majority is made during the exponential growth phase and when she reached the plateau she was almost 90% for the three metals. Both strains had shown a high resistance degree to all three metals studied, especially cadmium (a highly toxic metal) with *Burkhlderia fungorum*, which present an excellent biological tool for heavy metals bioremediation because of its efficiency, reliability and low cost.

**Keywords:** *Burkholderia fungorum. Pseudomonas putida*, bioremediation, cadmium, copper, zinc, heavy metals