

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة 20 أوت 1955- سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Ecologie et environnement

Spécialité: Protection des écosystèmes

Intitulé :

BIOREMEDIATION DU CHROME HEXAVALENT

Présenté par:

Daiboun Sahel Imane

FeninekhDjihane

MedjadiAmani

TeffoutiAdra

Membres de jury:

BOUHAYEN SALAH (MCA) Président univ. Du 20 Août 1955 – Skikda

MACHIA LEILA (MAA) Promotrice univ. Du 20 Août 1955 – Skikda

GUEDDAH DORIA (MCA) Examinatrice univ. Du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" qui nous a donné

Le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nous remercions très sincèrement notre encadreur **Dr .Maachiapoursa** permanenté, sa disponibilité et ses conseils pertinents qui ont grandement facilité ce travail.*

Nous tenons à remercier également l'ensemble des membres du jury qui ont accepté d'évaluer notre travail.

Nous voudrions remercier l'ensemble des ingénieurs de Laboratoire de Microbiologie

Sans oublier la responsable de laboratoire, pour leurs aides durant la période de réalisation de ce travail.

Nous remercions les ingénieurs de l'ONEDD de nous avoir aidées pendant la période d'attente et surtout M. SAFA pour ses conseils et son soutien

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui sont, de près ou de loin, ont apporté leur contribution à ce travail.

الإهداء

بعد مسيرة دراسية دامت سنوات حملت في طياتها الكثير من الصعوبات والمشقة والتعب .ها أنا اليوم أقف على عتبة تخرجي أقطف ثمار تعبتي وأرفع قبعتي بكل فخر . فاللهم لك الحمد قبل أن ترضى ولك الحمد إذا رضيت ولك الحمد بعد الرضا .لأنك وفققتني على إتمام هذا العمل وتحقيق حلمي

اهدي هذا العمل

إلى المرأة التي صنعت مني فتاة طموحة وتعشق التحديات . قدوتي الأولى التي منها تعرفت على القوة والثقة بالنفس لمن رضاها يخلق لي التوفيق (أمي) أطل الله في عمرك بالصحة والعافية.

إلى ذلك الرجل العظيم الذي أخرج أجمل ما في داخلي وشجعني دائما للوصول إلى طموحاتي. رجل علمني الحياة بأجمل شكل وبذل كل ما بوسعه ولم يبخل (أبي) أدامك الله ظلا لنا

إلى ملائكة رزقني الله بهن لأعرف من خلالهن طعم الحياة الجميلة. تلك الملائكة اللاتي غيرن مفاهيم الحب والصداقة والسند في حياتي أخواتي (روضة، أحلام، ألاء ...) جعلني وإياكن من الباريات.

إلى سندي والكتف الذي أستند إليه دائما. ضمادات قلبي ضروريات الحياة. حصن وحب وسعادة, القريبين من القلب و الداعمين إخوتي (وسيم .محمد).

إلى صديقات روعي الذين أمدوني دائما بالقوة وكانوا موضع الاتكاء في كل عثراتي وكانوا لي سندا وسهلوا طريقي

إلى شركائي في هذا النجاح (مجدة, إيمان , جيهان)

إلى جميع من أمدوني بالقوة والتوجيه أمن بي ودعمني في أوقاتي الصعبة لأصل إلى ما أنا عليه الآن, دمتم لي سندا لا عمر له.....

عذراء تفوتي

الى صاحب السيرة العطرة، والفكر المُستنير؛ فلقد كان له الفضل الأوّل في بلوغي التعليم العالي
أطال الله في عُمره ،(والدي الحبيب)
إلى من وضعتني على طريق الحياة، وجعلتني رابط الجأش وراعتني حتى صرت كبير (أمي الغالية)، أطال الله في عمرها
، حفظهم الله لي و أدامهم تاج فوق رأسي.
إلى إخوتي شهرزاد ، فارس ، اكرام و آخر العنقود زكريا ؛
إلى خالاتي العزيزات على قلبي سوسو و نورة و
. إلى صديقاتي و الأقرب لقلبي كإخوتي أسماء و زينب و بشرى ، من كان لهم بالغ الأثر في مساندتي و كانوا دائما بجانبني
. إلى زميلاتي في إعداد هذه المذكرة
إلى جميع أساتذتي الكرام و خاصة الأستاذة المشرفة علينا (الأستاذة معاشية) ؛ كلهم لم يتوانوا في مد يد العون لنا
. أهدى لكم كل الشكر و الامتنان

Dédicace

Tout au début, je tiens remercier Allah de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

A la lumière des mes jours la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur : ma chère mère que j'adore.

A mes frères Saif el islam, AHCEN , Houdaifa , et mon cœur aboudi : pour votre soutien et encouragements, vous occupez une place particulière dans mon cœur. Je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir radieux de bonheur et de succès.

Et je dédie mes remerciements particuliers au superviseur pour notre travail Mme Maachia .L , Merci beaucoup sans vos efforts nous ne serions pas là aujourd'hui , Enfin, je dédie ce travail à mon père décédé.

MedjadiAmani

إهداء

الحمد لله وكفى والصلاة على الحبيب المصطفى وأهله ومن وفى
أشكر الله العلي القدير الذي أنعم علي بنعمة العقل والدين القائل في محكم التنزيل "وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ
عَلِيمٌ" سورة يوسف آية 76... صدق الله العظيم . وقال رسول الله (صلي الله عليه وسلم): " من صنع
إليكم معروفًا فكافئوه, فإن لم تجدوا ما تكافئونه به فادعوا له حتى تروا أنكم كافأتموه" (رواه ابو
داوود

أما بعد :

الحمد لله الذي وفقنا لتتمين هذه الخطوة في مسيرتنا الدراسية بمذكرتنا هذه ثمرة الجهد والنجاح بفضل
تعالى مهداة إلى الوالدين الكريمين حفظها الله وأدامهما نورا لدربي

أهدي تخرجي هذا إلى من علمني العطاء وإلى من أحمل اسمه بكل افتخار- وأرجو من الله أن يمد في
"عمرك لترى ثمارا قد حان قطافها بعد طول انتظار- "والدي العزيز
وإلى ملاكي في الحياة وإلى معنى الحب والحنان والتفاني وإلى بسملة الحياة وسر الوجود وإلى من كان
"دعائها سر نجاحي أغلى الحبايب "امي الحبيبة
وإلى من له الفضل الكبير في تشجيعي وتحفيزي ومن منة تعلمت المثابرة والاجتهاد وإلى من بهم أكبر
وعليهم أعتد وإلى من بوجودهم أكتسب قوة ومحبة لا حدود لها وإلى من عرفت معهم معنى الحياة
"إخوتي وأخواتي
وإلى من تحلوا بالإخاء وتميزوا بالوفاء والعطاء وإلى من برفتهم في دروب الحياة السعيدة والحزينة
"سرت وإلى من كانوا معي على طريق النجاح والخير "أصدقائي الأعزاء
بتوفيق من الله، وبدعاء من الأم لم يبق سوى خطوات قليلة لإنهاء مسيرتي الدراسية، شكرًا لكل من مد
لي يد العون

جيهان فنينخ

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumés

INTRODUCTION

CHAPITRE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le Chrome

1.1/ Toxicité du chrome

1.1.1 Dans l'eau

1.1.2 Toxicité chez l'homme

1.1.3 Toxicité chez les microorganismes

2. Bioremédiation

CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Description du site d'accueil

2. Matériel

2.1 Matériel expérimental

2.2. Réactifs et milieux de culture

2.3. Matériel biologique

3. Méthodes

3.1. Échantillonnage

3.2. Analyse physico-chimique

3.2.1. Dosage du chrome VI

3.2.2. Conductivité et salinité

3.3. Analyse microbiologique

3.3.1. Préparation des milieux de culture

3.3.2. Mise en culture

3.4. Identification des isolats

3.4.1. Observations macroscopique

3.4.1.1. pour les bactéries

3.4.1.2. pour les champignons

3.4.2. Observations microscopique

3.4.2.1. Etat frais

3.4.2.2. Coloration de Gram

- 3.5. Identification biochimique
 - 3.5.1. Mode opératoire
 - 3.5.2. Lecture de la Galerie API 20^E
- 4. Test de biodégradation
 - 4.1. Préparation des pré cultures
 - 4.2. Préparation des milieux de fermentation
 - 4.3. Récupération des biosurfactans
 - 4.4. Micro encapsulation

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats

- 1.1. Caractéristique de l'échantillon
- 1.2. Résultat de quelques paramètres physico-chimiques
- 1.3. Résultat de l'analyse microbiologique
 - 1.3.1. Résultat de l'observation macroscopique et microscopique des boîtes ensemencées
 - 1.3.2. Résultat des observations macroscopiques et microscopiques
- 1.4. Résultat de l'identification biochimique
 - 1.4.1. Lecture de la galerie API 20E
- 1.5. Résultats du test de la biodégradation

2. Discussion

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES FIGURES

Fig.1 : Appareil multi-paramètres (multi3420).

Fig.2 : Préparation des milieux de culture.

Fig.3 : Galerie miniaturisée API 20E

Fig.4 : Les réactifs de la lecture indirecte de l'API20E.

Fig.5 : Préparation des milieux de fermentations en batch

Fig.6 : Préparation des bio surfactants

Fig.7 : Extraction liquide -liquide

Fig.8 : Protocole de l'encapsulation bactérienne dans alginate par extrusion

Fig.9 : Les billes après la filtration

Fig.10 : Effluent de tannerie

Fig.11 : L'observation macroscopique des boîtes GN et Sabouraud

Fig.12 : Résultat d'Api 20E des bactéries sélectionnées .

Fig.13 : Taux de biodégradation du Cr(VI) par les trois souches sélectionnées

Fig.14 : Taux de biodégradation du Cr(VI) par les biosurfactants des trois souches sélectionnées.

LISE DES TABLEAUX

Tab.1 : Les compositions des boites de pétri.

Tab.2 : Les caractères de l'échantillon.

Tab.3 : Résultats des paramètres physico-chimiques.

Tab.4 : Résultats de l'ensemencement dans différents milieux de cultures

Tab.5: l'observation macroscopique et microscopique des souches sélectionnées.

Tab.6 : la lecture de la Galerie de l'Api A20.

LISE DES ABREVIATIONS

DPC : diphenylecarbazine

GN: gélose nutritif

Cr (VI) : chrome hexa valent

BN : bouillon nutritif

Cr (III) : chrome trivalent

°C : Degré Celsius

Ms: micro Siemens

Ch.: champignon

MRS:Man Rogosa Sharpe.

Résumé

Ce travail a pour objectif de tester la capacité de quelques souches microbiennes à tolérer et / ou dégrader le chrome hexavalent et de sélectionner un candidat pour la station pilote. Des analyses physico-chimiques et microbiologiques ont été entamées suivies d'une fermentation en batch des isolats sélectionnés, pour extraire leurs biosurfactants. Deux isolats purs nommés G (prélevé de la station hydrothermale de Guelma) et R (rhizobactérie des légumineuses) ont également été testés pour évaluer leur capacité de dégradation du chrome hexavalent. Afin de préserver ces derniers pour une éventuelle application dans la station pilote, une approche de microencapsulation sous forme de microbilles d'alginate a été envisagée pour le test de biodégradation du chrome hexavalent. Le résultat du dosage du chrome de l'effluent de tannerie de Jijel est de l'ordre de 0.1mg /l, les observations macroscopiques des boîtes de pétriensemencées par l'effluent de tannerie sur gélose nutritive et Sabouraud sans et avec dichromate de potassium nous a permis de sélectionner deux isolats, il s'agit d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* et d'un champignon *Geotrichum* seuls eucaryote capable de tolérer une dose de chrome de l'ordre de 2mg/ml et dégrader le chrome hexavalent. L'identification biochimique nous a permis de rattacher R à *Klebsiella oxytoca* et G à *Klebsiella ornithinolytica* cette dernière possède une capacité de dégradation du chrome hexavalent remarquable une résistance élevée au chrome hexavalent. Elle sera élue candidate pour les tests d'optimisation dans la station pilote afin d'explorer son potentiel dans des projets de bioremédiation pour des sites contaminés par des métaux lourds.

Mots clés : *Klebsiella ornithinolytica* , *Klebsiella oxytoca* , *Geotrichum*, *Saccharomyces cerevisiae* , bioremédiation ,chrome hexavalent.

Abstract

This work aims to test the ability of some microbial strains to tolerate and / or degrade hexavalent chromium and to select a candidate for the pilot station. Physico-chemical and microbiological analyzes were initiated, followed by batch fermentation of the selected isolates, to extract their biosurfactants. Two pure isolates named G (taken from the hydrothermal station of Guelma) and R (legume rhizobacteria) were also tested to assess their ability to degrade hexavalent chromium. In order to preserve the latter for a possible application in the pilot station, a microencapsulation approach in the form of alginate microbeads was considered for the biodegradation test of hexavalent chromium. The result of the chromium assay of the Jijel tannery effluent is of the order of 0.1mg / l, the macroscopic observations of petri dishes seeded with the tannery effluent on nutrient agar and Sabouraud without and with potassium dichromate allowed us to select two isolates, it is a yeast *Saccharomyces cerevisiae* and a fungus *Geotrichum* alone eukaryotic capable of tolerating a dose of chromium of the order of 2mg/ml and degrading hexavalent chromium. The biochemical identification allowed us to attach R to *Klebsiella oxytoca* and G to *Klebsiella ornithinolytica*, the latter has a remarkable capacity for degrading hexavalent chromium and a high resistance to hexavalent chromium. It will be elected candidate for optimization tests in the pilot station to explore its potential in bioremediation projects for sites contaminated by heavy metals.

Keywords: *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Geotrichum*, *Saccharomyces cerevisiae*, bioremediation, hexavalent chromium.

المخلص

يهدف هذا العمل إلى اختبار قدرة بعض السلالات الميكروبية على تحمل و / أو تحلل الكروم سداسي التكافؤ واختيار مرشح للمحطة التجريبية. بدأت التحاليل الفيزيائية والكيميائية والميكروبيولوجية ، تلاها تخمير دفعي للعزلات المختارة مأخوذة من المحطة الحرارية) G لاستخلاص موادها الخافضة للتوتر السطحي. تم اختبار اثنين من العزلات النقية المسماة لتقييم قدرتها على تحطيم الكروم سداسي التكافؤ. من أجل الحفاظ على هذا (البقول الجذرية) R و (Guelma المائية ل الأخير لتطبيق محتمل في المحطة التجريبية ، تم النظر في نهج الكبسلة الدقيقة في شكل ميكروبيدات الجينات لاختبار التحلل البيولوجي للكروم سداسي التكافؤ. كانت نتيجة فحص الكروم لمياه الدباغة السائلة في جيجل بترتيب 0.1 ملجم / لتر ، وقد سمحت لنا الملاحظات العيانية لأطباق بتري المصنفة بمخلفات المدابغ على أجار المغذيات وسابورو بدون وثاني وحده حقيقيات Geotrichum وفطر Saccharomyces cerevisiae كرومات البوتاسيوم باختيار عزلتين ، هي خميرة والكروم السداسي التكافؤ المتحلل. سمح لنا التحديد الكيميائي mg / ml النوى قادر على تحمل جرعة من الكروم بترتيب 2 حيث تتمتع الأخيرة بقدرة ملحوظة ، Klebsiella ornithinolytica - G و Klebsiella oxytoca - R الحيوي يربط على تحلل الكروم سداسي التكافؤ ومقاومة عالية للكروم سداسي التكافؤ. سيتم انتخابه كمرشح لاختبارات التحسين في المحطة التجريبية لاستكشاف إمكاناته في مشاريع المعالجة الحيوية للمواقع الملوثة بالمعادن الثقيلة.

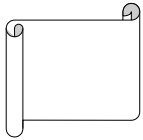
الكلمات المفتاحية: Klebsiella ornithinolytica، Klebsiella oxytoca، Geotrichum، Saccharomyces cerevisiae ، المعالجة البيولوجية ، الكروم سداسي التكافؤ ،

INTRODUCTION

Le problème de l'environnement contaminé est aujourd'hui très préoccupant pour les pays émergents (*Mishra et Bharagava, 2016*). L'industrialisation rapide a un impact significatif sur la qualité des écosystèmes en raison des décharges énormes de métaux lourds (*Thatheyus et Ramya, 2016*). Le rejet massif et brutal de polluants toxiques dans l'environnement, constitue un risque écologique important pour la faune et la flore, ainsi qu'un danger réel pour la santé de l'homme. L'équilibre des écosystèmes est devenu menacé. Face à cette problématique, les chercheurs tentent de trouver des solutions pour dépolluer l'environnement.

Plusieurs technologies de dépollution (adsorption, précipitation chimique) ont été développées pour éliminer le Cr (VI) des effluents industriels afin de protéger l'environnement et réutiliser les eaux. Cependant, la majorité de ces technologies sont coûteuses, notamment lorsqu'elles sont appliquées pour les effluents à haut débit. Par conséquent, la technique d'adsorption sur les supports biologiques (biosorption) qui est assez disponible et peu coûteuse peut être à l'origine d'un processus de dépollution vert et économiquement rentable (*Camacho-Chabet al., 2018*).

Tout en suivant une démarche scientifique, logique et cohérente, l'objectif de notre travail était de parvenir à tester des microorganismes, capables de tolérer ou d'éliminer le chrome hexavalent. Dans ce contexte, notre modeste travail sera une contribution à la mise au point d'un bioprocédé pour que la souche la plus puissante sélectionnée trouvera une application dans le domaine du traitement des eaux contaminées par le chrome hexavalent.



SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le chrome

1.1. Toxicité du chrome :

Le chrome présente une toxicité très élevée qui dépend non seulement de sa concentration mais aussi de son degré d'oxydation. Le Cr (VI), du fait de sa solubilité, s'est retrouvé en interaction avec beaucoup d'organismes aquatiques et terrestres sans oublier l'homme.

1.1.1. Dans l'eau :

Les quantités élevées du Cr(VI) présentes dans les systèmes aquatiques sont liées pour l'essentiel à des émissions d'origines industrielles, elles posent des sérieux problèmes pour la vie aquatique. Le Cr(VI) est également un oxydant puissant, il forme des oxydes tels que le chromate (CrO_4^{2-}) (Mamaisetal.,2016; Qambraniet al., 2016). Une solubilité élevée de ce métal en milieu aqueux facilite sa percolation dans les eaux souterraines, ce qui lui confère une grande mobilité dans les écosystèmes. Des mesures récentes du Cr(VI) dans une rivière au Columbia provenant des eaux souterraines étaient égales à $100\mu\text{g/L}$ au milieu de la rivière (Markad et al. 2017; Wang et al. 2017). Cette teneur très élevée peut menacer la vie des organismes aquatiques, comme les moules (*Lampsilissiliquoidea*), les invertébrés (*Amphipods, Hyalellaazteca*) et les poissons (Besser et al.2004; Wang et al. 2017). En effet les poissons exposés au Cr(III) et au Cr(VI) présentent des mouvements brusques, une hypersécrétion de mucus, ouvrent la bouche pour l'essoufflement, et changent de couleur (Nisha et al. 2016).

Vera-Candioti et al., (2011), ont démontré que *Cnesterodondecemmaculatus*, vivant en Amérique néotropical est sensible au Cr(VI), car ce dernier réduit sa survie et sa croissance l'exposition de cette espèce à des concentrations élevées du Cr(VI) pendant 24 heures suffisent pour provoquer une mortalité de 63% de ces poissons.

1.1.2. Toxicité chez l'homme :

l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis a classé le chrome hexavalent dans le groupe «A» en raison de son pouvoir tératogène, cancérigène et mutagène, et parmi les 20 premiers produits chimiques les plus dangereux (Joutey et al, 2015; Arshad et al, 2017;Shahid et al, 2017). En principe, l'homme absorbe peu de chrome par inhalation, mais pour l'essentiel au travers des aliments et de l'eau potable. Une fois à l'intérieur de la cellule, le chrome se lie au glutathion et grâce au soufre présent dans cette molécule, il est réduit en chrome (V) puis en(IV) (Desjardins, 2002).

1.1.3. Toxicité chez les microorganismes :

Le chrome n'est pas un métal essentiel pour la croissance des microorganismes, mais sa présence peut être éventuellement tolérée par les microorganismes. Dans certains cas, l'élément peut être utilisé comme accepteur final d'électrons s'il s'agit de Cr(VI). À de fortes concentrations, le Cr(VI) a des effets toxiques et mutagènes. 10 à 12 mg de Cr(VI) par litre peuvent inhiber le développement de bactéries du sol alors que les mêmes concentrations en Cr(III) n'ont aucun effet (*Ross et al. 1981*). Le chrome a un effet toxique sur les bactéries saprophytes et nitrifiantes, sur les champignons filamenteux, les algues et sur le phytoplancton. Le chrome Cr(VI) altère le matériel cellulaire, le métabolisme et les réactions physiologiques (*Desjardins, 2002*).

1.2. Procédés d'élimination du chrome :

L'élimination du Cr(VI) comme tous les métaux lourds fait appel à des procédés physicochimiques et/ou des procédés biologiques basés sur l'utilisation des bactéries, des champignons et des plantes (Bioremédiation, biosorption) (*Mohan et Pittman, 2006 ; Legrouriet et al, 2017*).

2. Bioremédiation

Le procédé est connu pour l'élimination des métaux lourds (Cr) par des matériaux biologiques ; bactéries (*Bacillus amyloliquefaciens, Escherichia*) (*Patra et al, 2010*) champignons (*Trichoderma sp, Aspergillus, Penicillium janthinellum*), levures, les plantes et les déchets agricoles (résidus de pommes, écorces de mélèze, grignons d'olives, canne à sucre) et les déchets solides lignocellulosiques, ces matériaux sont dits « biosorbants » (*Vidali, 2001; Blázquez et al, 2009; Ullah et al, 2013; Fathy et al, 2015; Sibi, 2016; Vendruscolo et al, 2017*).

En plus des efforts de recherche dans la découverte et l'application thermostables d'enzymes, les cultures des hyperthermophiles peuvent avoir le potentiel dans la bioremédiation environnementale. En effet, l'utilisation de ces microorganismes et de leurs métabolites et enzymes qu'ils sécrètent ont un large éventail d'exploitation dans de nombreuses applications industrielles et offrent des solutions potentielles aux dommages environnementaux (*Aanniz et al., 2015*).

Des recherches sont en cours pour déterminer leur potentiel à produire plusieurs nouveaux produits importants sur le plan biotechnologique (*Nshimiyimana et al., 2018*).

La capacité des rhizobactéries et en particulier les PGPR (Plant Promoting Growth Rhizobacteria) ont été également évoqués en bio remédiation, ils tolèrent la présence des éléments traces métalliques et réduisent leurs impacts dans les différents biotopes. Ils sont considérés comme un outil important en phytoremediation (*Glick, 2003*).

La capacité de ces microorganismes ne se limite pas uniquement à fournir une source d'azote assimilable aux plantes en fixant l'azote atmosphérique, mais plusieurs autres fonctions ; fournir une source de phosphore assimilable aux plantes en libérant les phosphates liés dans le sol, la bioremédiation des sols pollués par les métaux lourds et la production de phytohormone. Vingt six isolats ont été testés pour leur résistance aux métaux lourds : Co^{++} , Ni^{++} , Cr^{+VI} , Cu^{++} , Pb^{++} , Fe^{++} , Cd^{++} et Zn^{++} . Les résultats obtenus montre que 100% des isolats ont résisté au Fe^{++} jusqu'à 47mM et au Hg^{++} jusqu'à 20mM sans aucune inhibition de la croissance. Pour les autres métaux les isolats ont suivi l'ordre de résistance suivant $\text{Pb}^{++} > \text{Cr}^{+VI} > \text{Cu}^{++} > \text{Ni}^{++} > \text{Cd}^{++} > \text{Zn}^{++} > \text{Co}^{++}$ (de la résistance la plus importante jusqu'à la résistance la plus faible) (*Lemboub, 2019*).

**MATERIEL
ET
METHODES**

1. Description des sites d'accueil

Notre travail a été réalisé au niveau de deux sites ; l'un au laboratoire de microbiologie N°213 situé au niveau du Hall technologique de la Faculté des Technologies de l'Université de Skikda sur une période de 2 mois (du 7 mars au 7 mai) pour l'analyse microbiologique, et 5 mars au 08 mai pour les analyses physico-chimiques au niveau du laboratoire de l'Observatoire nationale de l'environnement et du développement durable (ONEDD) de Skikda.

2. Matériel

2.1. Matériel expérimental :

- ♣ Agitateur et plaque chauffante
- ♣ Ampoule à décantation
- ♣ Anse de platine
- ♣ Autoclave
- ♣ Bain-marie (Gerhardt Bonn)
- ♣ Balance
- ♣ Barreau magnétique
- ♣ Bec Bunsen
- ♣ Becher
- ♣ Béchers de 1000 ml
- ♣ Boîtes de pétri
- ♣ Cure dent stérile
- ♣ Cuve
- ♣ Distillateur
- ♣ Écouvillon
- ♣ Entonnoir
- ♣ Erlenmeyer de 500 ml
- ♣ Etuve(Memmert UNB100)
- ♣ Fioles de 50 ml
- ♣ Flacon
- ♣ Lame, lamelle
- ♣ Microscope optique (Olympus Optical CHK2-F-GS)
- ♣ Papier filtre Whatman

- ♣ Pipette Pasteur
- ♣ Pipettes graduées de 10 ml et de 2 ml
- ♣ Pompe à vide
- ♣ Réfrigérateur
- ♣ Seringue (2.5ml)
- ♣ Spatule
- ♣ Spectrophotomètre UV – Visible (UV mini1240)
- ♣ Support

2.2. Réactifs et milieux de culture :

- ♣ Acétate d'éthyle
- ♣ Acide chlorhydrique HCl
- ♣ Acide sulfurique
- ♣ Agar-agar
- ♣ Alginate
- ♣ Bleu de méthylène
- ♣ Bouillon (MRS)
- ♣ Bouillon nutritif
- ♣ Chlorure de calcium
- ♣ Chlorure de sodium Na Cl
- ♣ Dichromate de potassium (K₂Cr₂O₄)
- ♣ Diphénylcarbazine
- ♣ Eau distillée
- ♣ Eau minérale
- ♣ Eau oxygénée H₂O₂
- ♣ Éthanol
- ♣ Extrait de levure
- ♣ Fuchsine
- ♣ Gélose nutritive
- ♣ Gélose potato dextrose agar (PDA)
- ♣ Glucose
- ♣ Glycérine
- ♣ Huile à immersion
- ♣ Huile d'olive

- ♣ Hydroxyde de sodium NaOH
- ♣ Kovacs
- ♣ Lugol
- ♣ Nitrate et nitrite
- ♣ Peptone
- ♣ Sabouraud dextrose agar
- ♣ TDA
- ♣ Tryptone
- ♣ Violet de gentiane
- ♣ Vp1 et Vp2

2.3. Matériel biologique :

Constitué de levure *Saccharomyces cerevisiae*, des bactéries lactiques du yaourt *Streptococcus thermophiles* et *Lactobacillus bulgaricus*, deux isolats nommés G (source hydrothermale de Guelma) et R (rhizobactérie) fournis par l'encadreur.

3. Méthodes

3.1. Echantillonnage :

Les échantillons ont été collectés dans un flacon stérile, au mois de mars 2023, à partir des effluents de la tannerie de Jijel. Les échantillons recueillis ont été transportés au laboratoire et conservés.

3.2. Analyses physico-chimiques (Rodier, 2009)

3.2.1. Dosage du chrome(VI) :

3.2.1.1. Principe :

En solution légèrement acide, le Cr(VI) réagit avec diphénylcarbazide (DPC) pour donner une coloration rouge violet susceptible d'un dosage par spectrophotométrie.

3.2.1.2. Mode d'opérateur :

- Acide sulfurique
- Solution d'acide sulfurique
 - Eau distillée
 - Acide sulfurique

Verser avec précaution 5 ml d'acide sulfurique dans un 50 ml d'eau. Après refroidissement, transvaser dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajuster le volume

- Alcool éthylique
- Solution acide DPC

- 0.2 g DPC
- 10 ml alcool éthylique
- 40 ml Solution d'acide sulfurique

Conservée au réfrigérateur et en flacon teinté, cette solution est stable un mois environ

Préparer à partir de la solution fille des dilutions couvrant la gamme de la concentration souhaitée.

A/ Etablissement de la courbe d'étalonnage :

- Dans une fiole jaugée bouchée émeri introduit 50 ml d'eau à analyser et 3 ml de la solution acide de DPC
- Agiter et laisser au repos 10 minutes.
- Préparer un témoin dans les mêmes conditions avec 50 ml d'eau distillée.
- Effectuer les lectures au spectromètre à la longueur d'onde de 540 nm et tenir compte de valeur lue pour le témoin.
- Se reporter à la courbe d'étalonnage

3.2.2. Détermination de la conductivité et salinité :

3.2.2.1. Principe :

La conductivité électrique d'une eau est la conductance d'une colonne d'eau comprise entre deux électrodes métalliques. La mesure de la conductivité permet d'apprécier la quantité de sels dissous (degré de minéralisation) dans l'eau.

3.2.2.2. Mode d'opérateur :

- La détermination de la conductivité et salinité se fait à l'aide de l'appareil multi-paramètres
- Le rinçage de l'appareil avec l'eau distillée,
- Immerger l'électrode de l'appareil dans la solution à analyser jusqu'à la stabilisation de la conductivité et la salinité.
- Lire le résultat sur l'appareil.



Figure 1: Appareil multi-paramètres (multi3420).

3.3. Analyse microbiologique :

Toutes les manipulations ont été effectuées près du bec Bunsen pour assurer l'asepsie.

3.3.1. Préparation des milieux de culture :

3.3.1.1. Principe :

Ensemencement.

3.3.1.2. Mode opératoire :

- Dans un bécher de 1000 ml préparer la gélose Sabourauden versant 32.5 g avec l'eau distillée jusqu'à 500 ml
- Dans un bécher de 1800 ml préparer 28 g de gélose nutritive avec 1000 ml de l'eau distillée.
- Dans un bécher de 1000 ml préparer le bouillon nutritif en versant 20 g avec l'eau distillée jusqu'à 500 ml
- Placer les trois béchers sur les plaques chauffante avec agitation jusqu'à ébullition
- Transvaser les milieux dans des flacons pour stérilisation à 120°C pendant 20 min
- Verser les géloses en surfusion dans des boîtes de pétri.

NB : Nous procédons de la même manière en ajoutant du dichromate de potassium dans les milieux de culture.



Figure2: Milieux de culture coulés dans les boîtes de pétri

3.3.2. Mise en culture :

La mise en culture ou ensemencement vise à favoriser la multiplication des microorganismes sur un milieu nutritif solide (GN, Sabouraud), nous avons utilisé la technique d'ensemencement par épuisement en stries (*Ghezlane-Tebibel et al., 2008*).

La répartition des boîtes se fait selon le tableau suivant

Tableau1 : Les compositions des boîtes de pétri

Les composants	Le nombre de boîte
Gélose+ dichromate	03
Gélose+ bactéries lactiques	01
Gélose+ dichromate + bactéries lactiques	01
Gélose + dichromate + levure	01
Gélose+ levure	01
Gélose + MRS + échantillons	02
Gélose + MRS + bactéries lactiques	02
Gélose + dichromate + MRS + bactéries lactiques	02

3.4. Identification des isolats :

L'identification des bactéries isolées a été réalisée à l'aide d'une étude morphologique, physiologique et biochimique.

3.4.1. Observation macroscopique :

Le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation.

3.4.1.1. Pour les bactéries :

Le premier caractère important dans la description de la colonie et sa forme générale de nombreuses espèces bactériennes formait des colonies rondes. Cependant d'autres donnent des colonies aux formes plus ou moins variées. En plus d'autres caractéristiques telles que : le contour, la surface, la couleur.

3.4.1.2. Pour les champignons

La détermination d'un champignon se fait en utilisant des critères macroscopiques de forme, de couleur d'odeur.

3.4.2. Observation microscopique :

Étudier la morphologie microbienne au microscope photonique, c'est recherché la forme des bactéries et leur mode de groupement.

3.4.2.1. Etat frais :

L'état frais est l'observation microscopique entre lame et lamelle de microorganisme vivant qui permet de mettre en évidence les 3M ; morphologie, mobilité, mode de regroupement. L'observation a été réalisée par un microscope optique (objectif x10 et x40).

3.4.2.2. Coloration de Gram :

Elle permet de distinguer les bactéries Gram positif des Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification. La coloration de Gram peut être obtenue suivant divers protocoles techniques normalisée, obéissant tous aux mêmes principes et comprenant les mêmes étapes : fixation, coloration, décoloration et contre-coloration.

L'un des protocoles les plus usuels se déroule selon les étapes suivantes :

- Étalement et fixation par la chaleur de la suspension bactérienne sur une lame
- Coloration pendant une minute au violet de Gentiane ;
- Rinçage à l'eau ;
- Coloration au lugol pendant une minute ;
- Rinçage à l'eau ;
- Décoloration à l'éthanol à 95° jusqu'à élimination du colorant (environ 20s) ;
- Rinçage à l'eau ;

- Contre- coloration pendant 1 à 2 minutes par une solution de fuschine diluée ;
- Rinçage à l'eau.

Après séchage, la lame peut être observée au microscope avec un objectif à immersion x100. Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (*Bousseboua, 2002*).

3.5. Identification biochimique :

L'utilisation de la galerie miniaturisée API 20^E nous permettra d'identifier les souches testées



Figure 3 : Galerie Ani20E

3.5.1. Mode opératoire :

- Préparation de la galerie :

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;

Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte ;

Sortir la galerie de son emballage ;

Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

- Préparation de l'inoculum :

Préparer une suspension bactérienne dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune sur milieu Hektoen puis mettez dans l'étuve 37°C pendant 1 heure.

- Ensemencement de la galerie API 20E :

Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air ;

Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemencer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile ;

Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension ;

Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.

3.5.2.Lecture de la galerie :

Pendant l'incubation, le métabolisme bactérien produit des changements de couleur qui sont soit spontané, soit révélés par l'ajout de réactifs. Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture. Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test IND : ajouter une goutte de réactif Kovacs. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
- Note : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

- Interprétation :

L'identification a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel pour l'identification microbienne) (Murray et al.,2003).



Figure 4 : Les réactifs de la lecture indirecte de l'API20E.

4. Test de biodégradation :

4.1. Préparation des prés cultures :

Dans des tubes stériles contenant chacun 4 ml de BN,ensemencer les trois isolats sélectionnés pour le test de biodégradation, il s'agit du champignon (Ch), de la bactérie R et la bactérie G. La pré culture nous permet de revivifier l'isolat, incuber à 37°C pendant 24h ainsi la souche jeune pourra être testé.

4.2. Préparation des milieux de fermentation

- Stériliser 6erlenmeyer à l'étuve à 180°C pendant 1h 30 mn
- Refroidir les erlenmeyers
- Mettre 100 ml d'eau minérale dans chaque erlenmeyer
- Ajouter 1 ml de BN de chaque pré culture et 1 ml de source de carbone (huile d'olive)
- Agiter rigoureusement pour faciliter le contact entre le microorganisme et la source de carbone
- Ajouter la solution de dichromate juste pour trois erlenmeyers
- Incuber les erlenmeyer à température ambiante et à l'obscurité pendant 3 jours



Figure 5: Fermentation en batch sans dichromate

Après les 3 jours d'incubation, le volume de chaque erlenmeyer est divisé en deux, un volume destiné pour le dosage du chrome (voir 3.2.1.) et l'autre destiné à la micro encapsulation. Ceux destinés au dosage sont transvasés dans des flacons stériles en ajoutant dans chacun 3 ml d'acide sulfurique.



Figure 6 : Fermentation en batch avec dichromate

4.3. Récupération des biosurfactants:

Après incubation des erlenmeyers, nous entamons une technique de séparation liquide (*Grady et al., 2019*) pour récupérer les biosurfactants selon les étapes suivantes :

- Ajouter l'acétate d'éthyle au milieu de fermentation contenu dans les erlenmeyers (1v :1v)
- Transvaser le contenu de chaque erlenmeyer dans une ampoule à décantation
- Laisser à l'obscurité toute une nuit pour faciliter la séparation de la phase organique et la phase aqueuse.
- Récupérer la phase liquide dans un erlenmeyer et la phase organique dans un bécher

- Placer le bécher dans l'étuve à 37°C laisser jusqu'à évaporation du solvant
- Récupérer le biosurfactant pure.



Figure 7 : Extraction liquide - liquide

4.4. Microencapsulation

4.1.1. Principe :

L'immobilisation de la biomasse microbienne dans des matrices polymères lui confère une rigidité et une résistivité thermique avec une porosité optimale pour des applications pratique.

4.1.2. Mode d'opérateur :

- Préparer une solution d'alginate de sodium à 2% .
- Stériliser à l'autoclave 120 °C pendant 15min.
- Mélanger la solution d'alginate stérile avec 1 ml de suspension microbienne déjà préparée et homogénéisée aseptiquement.
- Agitation manuelle douce
- Le mélange a été introduit dans une seringue stérile (2,5 ml).
- La pression manuelle exercée sur le piston de la seringue permettait de faire tomber le contenu de la seringue goutte à goutte dans une boîte de pétri contenant une solution de coagulation de CaCl₂ à 0,05 M stérile.
- Les billes formées ont ensuite laissé pendant une heure sous agitation douce.
- Après 24h filtré les billes préalablement préparées à l'aide de papier filtre.

- les billes retirées de la phase aqueuse et lavées trois fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer le chlorure de calcium non lié de la surface des billes.
- Enfin les billes (l'encapsulat) filtrées puis conservés dans un sérum physiologique stérile à 4°C pour une utilisation ultérieure.

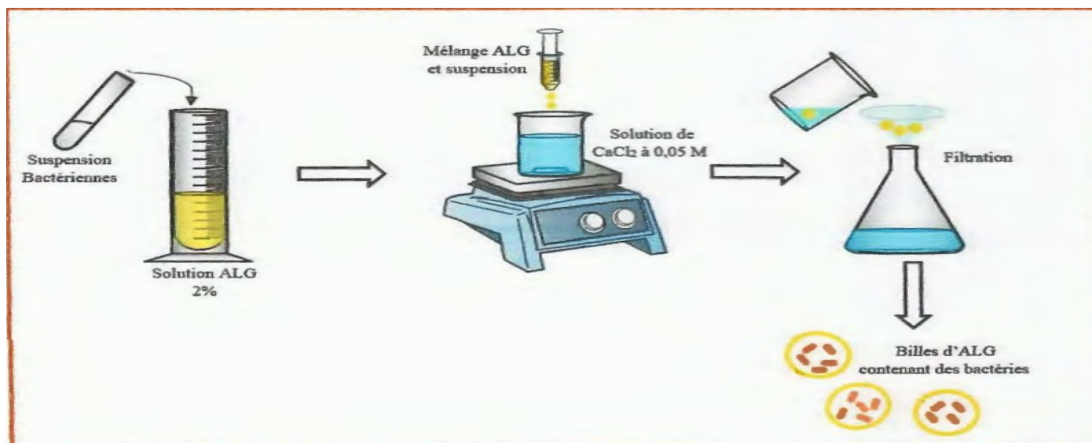


Figure 8: Protocole de l'encapsulation bactérienne dans alginate par extrusion

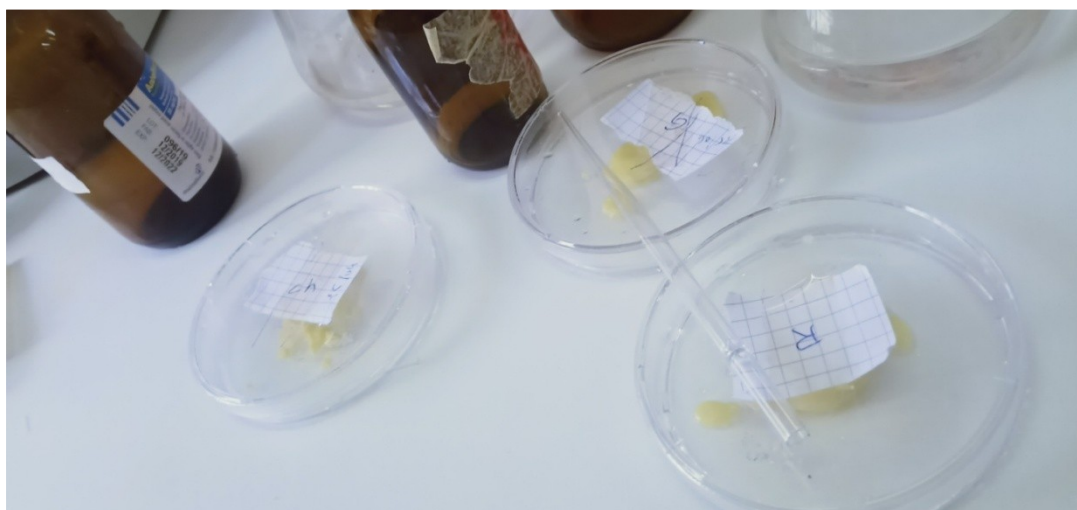


Figure 9 : Microbilles après la filtration.

**Résultats
Et
Discussion**

1. RESULTATS

1.1. Caractéristique de l'échantillon :

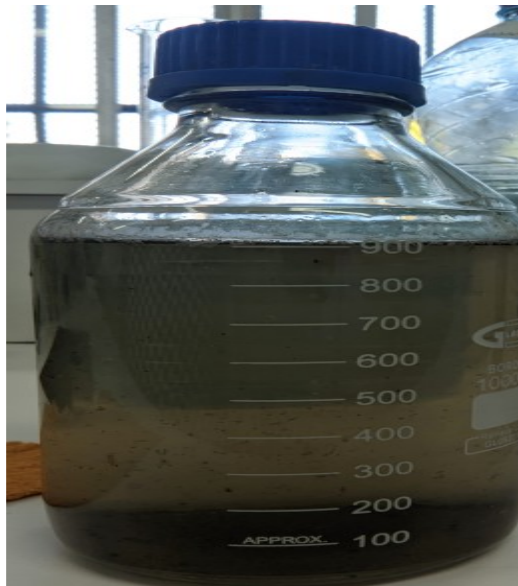


Figure 10 : Effluent de tannerie

L'observation macroscopique de l'effluent de la tannerie de Jijel montre les caractéristiques mentionnées dans le tableau suivant

Tableau 2 : Les caractères de l'échantillon

Aspect	Turbide
Couleur	Marron foncé
Odeur	Nauséabonde

1.2. Résultats des analyses physico-chimiques:

Les résultats obtenus des trois paramètres disponibles sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

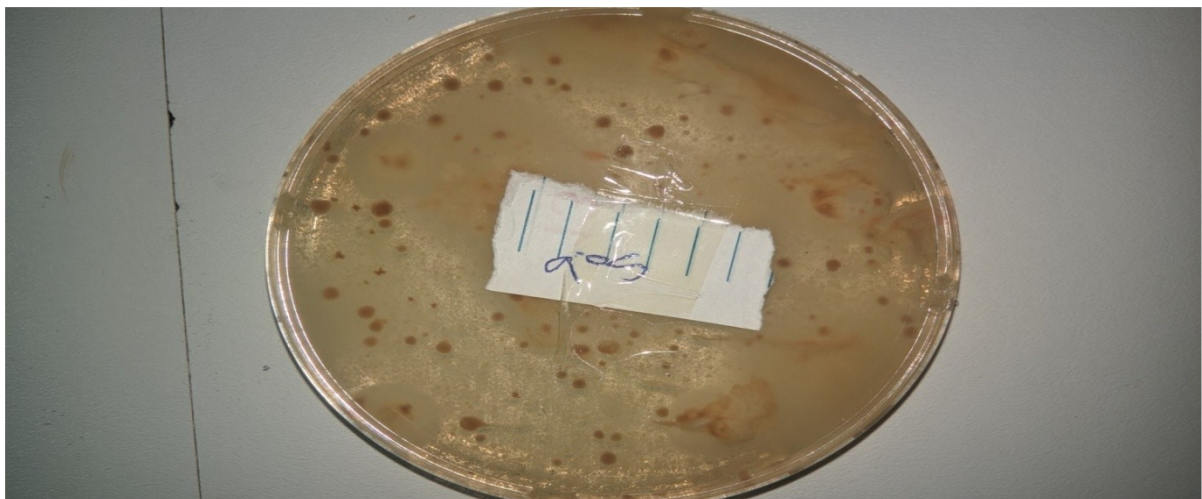
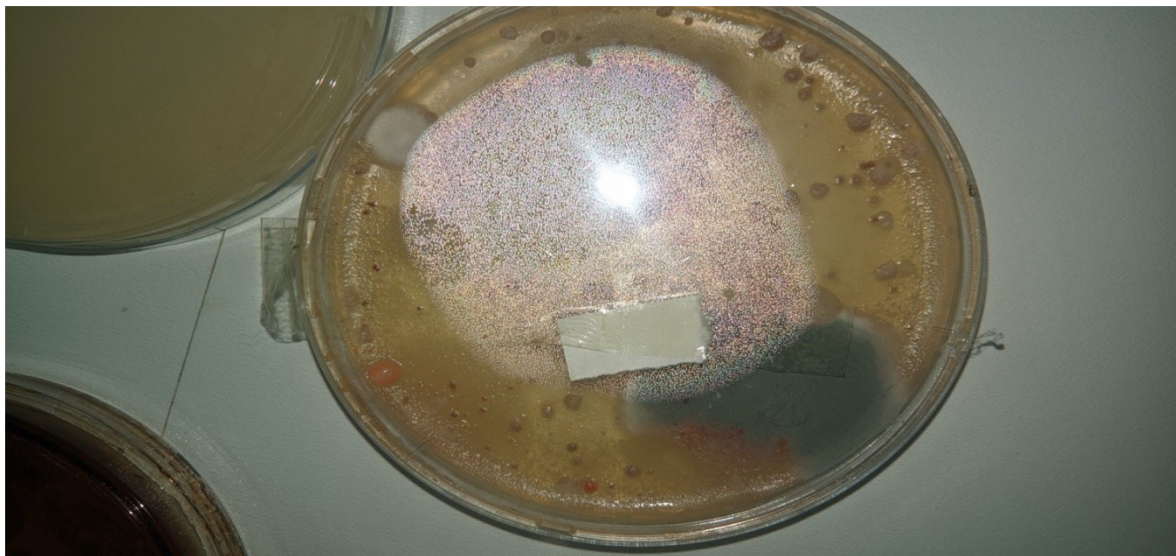
Tableau 3 : Résultats des paramètres physico-chimiques

Paramètres	Unité	Résultats	Valeur limite (Normentionale)
Cr (VI)	mg/l	0.1	0.5
Conductivité	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3.94	1500
Salinité	Ms/cm	2	2800

D'après les valeurs-limites, les résultats des paramètres physico-chimiques de l'effluent de tannerie obéissent aux normes.

1.3. Résultats de l'analyse microbiologique :

1.3.1. Résultat de l'observation macroscopique des boîtesensemencées:



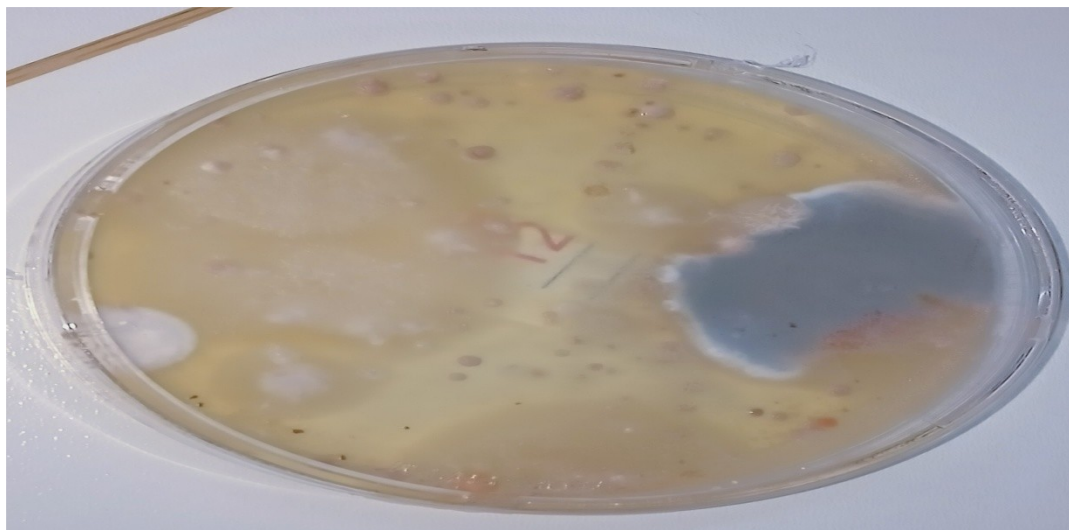


Figure 11 : Observation macroscopique des boîtes GN et Sabouraud

Tableau 4 : Résultats de l'ensemencement dans différents milieux de culture

Sans dichromate	Avec dichromate
A petri dish showing a yellowish agar medium. The surface is covered with a dense, mixed growth of various microorganisms, including white fuzzy patches and dark spots.	A petri dish showing a bright yellow agar medium. The surface is covered with a uniform, dense growth of yellowish-brown colonies. A gloved hand is visible at the bottom left corner. <p data-bbox="815 1800 863 1832">GN</p>



Sabouraud



GN



GN



GN



Sabouraud

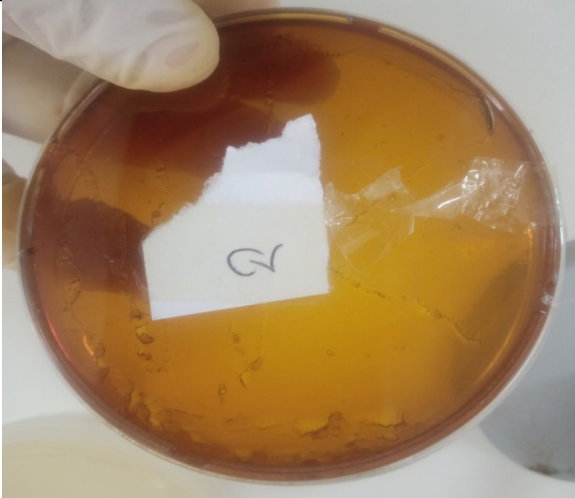

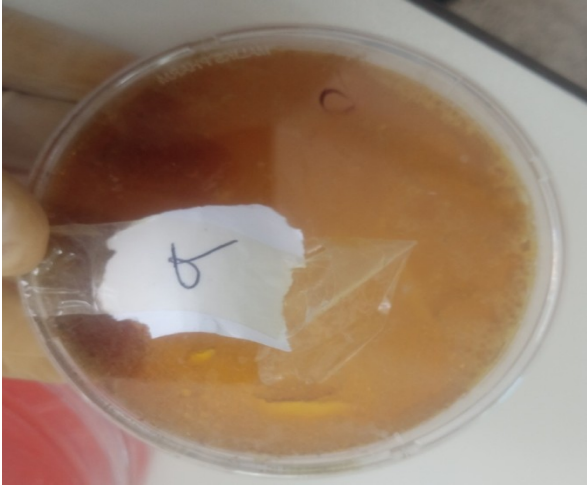
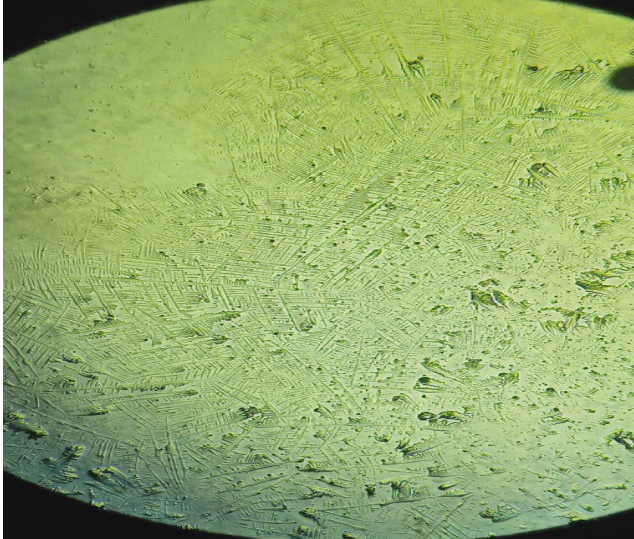


Sabouraud

Après 3 semaines d'incubation, l'observation macroscopique nous a permis de sélectionner deux isolats tolérant une dose de dichromate de potassium de l'ordre de 2 mg/ml le champignon et la levure, des halos observés dans les boîtes de pétri signifie la capacité de dégradation du dichromate de potassium.

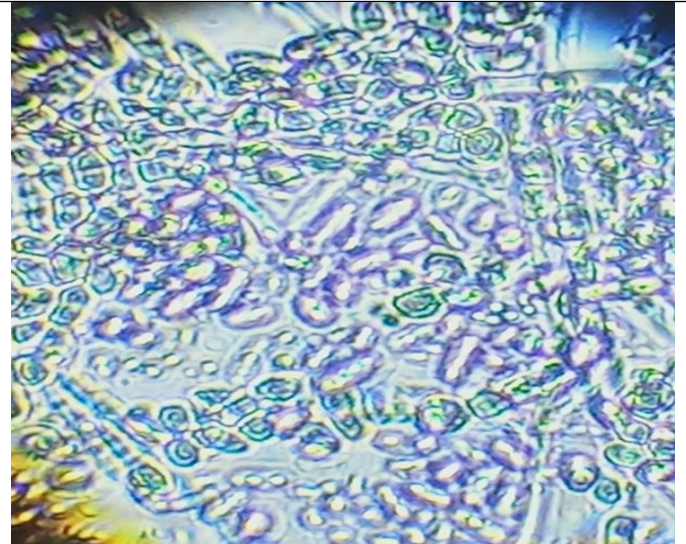
1.3.2. Résultat des observations macroscopiques et microscopiques des souches sélectionnés :

Tableau 5 : L'observation macroscopique et microscopique des souches sélectionnées

L'observation macroscopique	L'observation microscopique
 <p data-bbox="188 1196 571 1227">Colonie beige moyenne bombée</p>	 <p data-bbox="829 1229 1042 1261">Bacille immobile</p>
 <p data-bbox="188 1832 571 1863">Colonie beige moyenne bombée</p>	 <p data-bbox="829 1836 1042 1868">Bacille immobile</p>



Colonie blanche cotonneuse



Geotrichum sp.

1.4. Résultat de l'identification biochimique :

1.4.1. Lecture de la Galerie API 20 E:

Après 48h d'incubation à 37°C, dans quelles cupules doit-on rajouter des réactifs (TDA, Kovacs, VP1 et VP2, Nitrate et Nitrite) on obtient les résultats indiqués dans le tableau suivant :

Tableau 6 : la lecture de la Galerie de l'Api 20E

REACTIF	E	Bactérie	
		G	R
	ONPG	+	-
	ADH	+	-
	CDC	+	-
	ODC	+	-
	CIT	+	+
	H ₂ S	+	-
	URE	+	+
TDA	TDA	+	+
KOVACS	IND	+	+
VP1 + VP2	VP	+	+
	GEL	+	+
NITRATE+NITRITE	GL4	+	+
	MAN	+	+
	INO	+	+

	SOR	+	+
	RHA	+	+
	SAC	+	+
	MEL	+	+
	AMY	+	+
	ARA	+	+



Figure12:Résultats d'Api 20E des bactéries sélectionnées

Donc, à partir des résultats de l'API 20E, nous pouvons identifier les types de bactéries comme suit :

- la bactérie R : *Klebsiella Oxytoca* .
- la bactérie G : *Klebsiella Ornithinolytica* .

1.5.Résultat du test de la biodégradation :

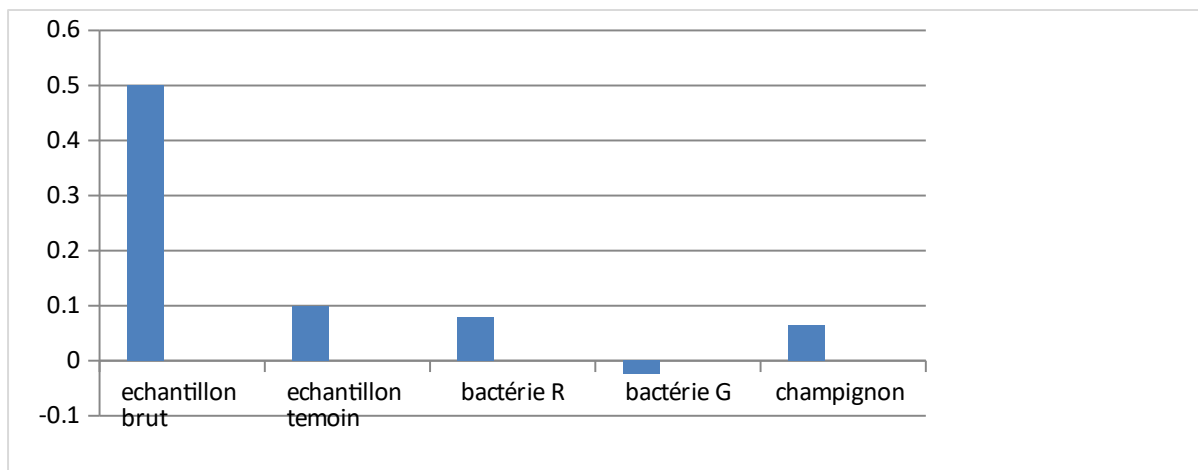


Figure13 : Taux de biodégradation du Cr(VI) par les trois souches sélectionnées.

Dans la fig.13 les Trois isolats ont montré une bonne capacité à réduire le Cr(VI) après 3 jours d'incubation en milieu liquide,cette réduction étant remarquable pour l'isolat G suivi par le champignon puis par l'isolat R. L'ordre de dégradation des isolats selon leurs absorbance; bactérie G (-0.0236nm),Champignon (0.0646nm) ; bactérie R (0.0786nm).Cette diminution du Cr(VI) dépend de leur tolérance, résistance et capacité de dégradation.

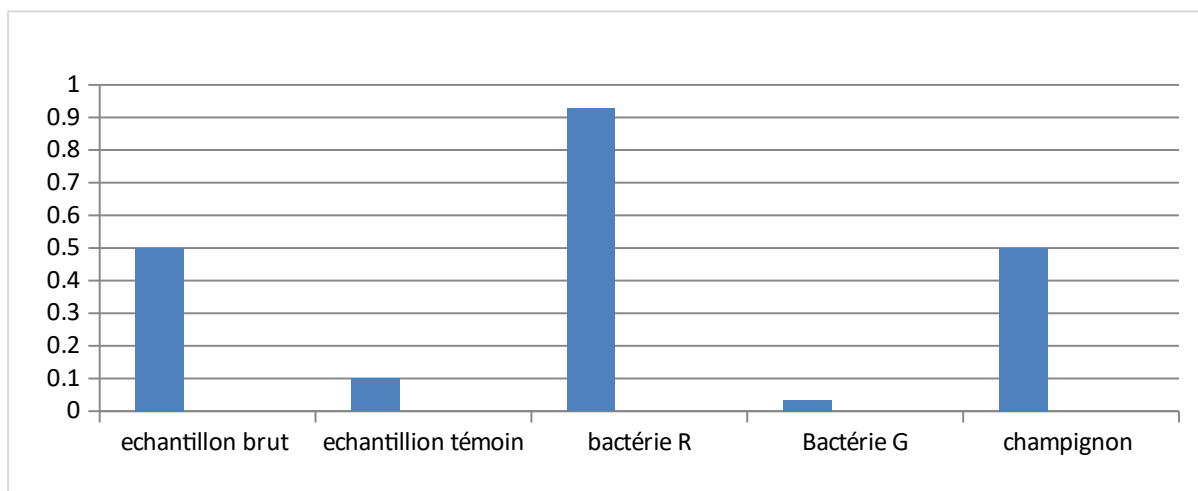


Figure14 :Taux de biodégradation du Cr(VI) par les biosurfactants des trois souches sélectionnées.

Dans la figure.14, seule le biosurfactant de la bactérie G qui a montré une bonne capacité à réduire le Cr(VI) en milieu liquide dans un délai de 3 jours.

2. Discussion

Selon le résultat du dosage du Cr (VI) de l'effluent de tannerie de Jijel (Tableau 3), la concentration est de l'ordre de 0.1mg/L, cette valeur est inférieure à la norme nationale ;la limite autorisée de Cr (VI) adoptée en Algérie pour les effluents industriels est de 0.5mg/L selon le décret exécutif n° 06-141 du 19 avril 2006 qui définit les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels (*J.O.R.A., 2006*).La limite autorisée de Cr (VI) selon US-EPA, est de moins de 0,05 mg/L elle doit être atteinte avant de déverser des eaux usées contaminées par du chromate dans l'environnement (*Sharma et Adholeya, 2011*).

Les résultats de l'observation macroscopique des boites de pétri ensemencées montrent que seule la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le champignon *Geotrichum* qui ont pu tolérer et résister à une dose de 2mg/ml de dichromate et ont pu aussi le dégrader, ce qui en fait des candidats potentiels intéressants pour des investigations supplémentaires concernant leur capacité à éliminer les métaux des eaux usées contaminées.

Selon *Ezzouhri (2009)*, trente-six micro-organismes, représentés par des souches de champignons et de levures, ont été isolés de sites contaminés par des métaux lourds à Tanger, au Maroc. Les champignons filamenteux isolés appartenaient aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Geotrichum*.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a également montré une capacité de tolérance remarquable ;selon *Gizaw et al.(2023)* les levures sont très actives en terme de séquestration du chrome hexavalent.

La bactérie G rattaché à *Klebsiella Ornithinolytica* est une bactérie hyperthermophile (>80°C) isolée de la station hydrothermale de Guelma a montré une capacité remarquable presque totale de réduction du chrome.L'étude de ces microorganismes est devenue un domaine de recherche majeure et fascinant pour les microbiologistes et les biochimistes. En effet, l'utilisation de ces microorganismes et de leurs métabolites et enzymes qu'ils sécrètent ont un large éventail d'exploitation dans de nombreuses applications industrielles, agricoles et médicinales et offrent des solutions potentielles aux dommages environnementaux (*Maouchi&Medjdoub ,2020*).

La bactérie R rattaché à *Klebsiella oxytoca* est une *rhizobactérie* qui peut être classé comme *PGPR* *Rhizobactéries* promotrices de la croissance des plantes (plant growth promoting rhizobacteria ; PGPR), elle a aussi montré sa capacité de dégradation.

Danish et al. (2019) et Gupta et al. (2019) ont montré la tolérance au Cr (VI) de *Agrobacterium fabrum* ,*Leclerciaadecarboxylata*, *Klebsiella sp. CPSB4* and *Enterobacter sp. CPSB49*.

Aransiola et al. (2017) ont également montré que le genre *Klebsiella* est très tolérant au chrome.

L'approche de microencapsulation des microorganismes et de leurs métabolites actifs dans la biorémediation du chrome 6 a été entamée pour l'utiliser dans la station pilote située dans l'O.N.E.D.D ; malheureusement cette dernière étape n'a pas été réalisée.

Conclusion

Conclusion

CONCLUSION

Cette étude visait à développer un agent de bioremédiation avec des cellules bactériennes comme composants pour le traitement des effluents de tannerie source de contamination par le chrome hexavalent.

Ce modeste travail nous a permis de tester la capacité de tolérance, de résistance et de dégradation du chrome hexavalent.

Nous pouvons conclure que nous avons pu sélectionner une bactérie hyperthermophile *Klebsiella ornithinolytica* possédant un potentiel remarquable comparé aux autres isolats.

Ces résultats préliminaires semblent indiquer un candidat de choix qu'il faut explorer dans le domaine de bioremédiation pour dégradé du chrome hexavalent.

Cependant, l'application réelle de la technologie de bioremédiation est toujours confrontée à un défi majeur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- **Aanniz, T., Ouadghiri, M., Melloul, M., Swing, J., Elfahim, E., Ibijbijen, J., Ismaili, M. & Ammar, M. (2015).** Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes, and desert soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2): 443-453.
- **Aransiola E. F., Ige O. A., Ehinmitola E. O. & Layokun S. K. (2017).** Heavy metals bioremediation potential of *Klebsiella* species isolated from diesel polluted soil. *African Journal of Biotechnology*, 16(19):1098-1105.
- **Arshad, M., Ali Khana, A. H., Hussain, I., Zaman B., Aneese, M., Iqbal M., Soja G., Linde C. & Yousaf S. (2017).** The reduction of chromium (VI) phytotoxicity and phytoavailability to wheat (*Triticum aestivum* L.) using biochar and bacteria. *Applied Soil Ecology*, 114: 90-98.

B

- **Bai, Y., Lu, Y., Shen, N., Lau, T. & Zeng, R. (2018).** Investigation of Cr (VI) reduction potential and mechanism by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* under glucose fermentation condition. *Journal of Hazardous Materials*, 344:585-592.
- **Besser, J. M., Brumbaugh, W. G., Kemble, N. E., May, T. W. & Ingersoll, C. G. (2004).** Effects of sediment characteristics on the toxicity of chromium (III) and chromium (VI) to the amphipod, *Hyalella azteca*. *Environmental Science & Technology*, 38(23) :6210-6216.
- **Bhattacharya, A. & Gupta, A. (2013).** Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich industrial wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 :6628–6637.
- **Biradar, N. V., Sindagi, A. S., Reddy, J. & Ingahlalli, S. S. (2012).** Bioremediation of Chromium in Pulp and Paper Processing Industrial Effluents by Indigenous Microbes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 3(12):1-7.
- **Blázquez, G., Hernáinz, F., Calero, M., Martín-Lar, M. A. & Tenorio, G. (2009).** The effect of pH on the biosorption of Cr (III) and Cr (VI) with olive stone. *Chemical Engineering Journal*, 148(2-3):473-479.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Bouroujna A., Ghebache M. & Merzouk R. (2022).** Evaluation de l'effet de l'encapsulation sur la survie d'une bactérie lactique dans les conditions gastro-intestinales. Master Microbiologie Appliquée. Université Sadik ben yahia Jijel
- **Bousseboua H., (2002).** Eléments de la microbiologie générale, techniques d'étude des bactéries. Université Mentouri Constantine, 148p.

C

- **Camacho-Chab, J. C., Castañeda-Chávez, M. R., Chan-Bacab, M. J.... & Otto Ortega-Morales B. (2018).** Biosorption of Cadmium by Non-Toxic Extracellular Polymeric Substances (EPS) Synthesized by Bacteria from Marine Intertidal Biofilms. *International Journal Environmental Research Public Health*, 15(2):314.
- **Cheung, K.H. & Gu, J. D. (2007).** Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential. *International Bio deterioration & Biodegradation*. 59(1):8-15.

D

- **Danish S., Kiran S., Fahad S., Ahmad N., Ali M.A., Tahir F.A., Rasheed M.K., Shahzad K., Li X., Wang D., Mubeen M., Abbas S., Munir T.M., Hashmi M.Z., Adnan M., Saeed B., Saud S., Khan M.N., Ullah A. & Nasim W. (2019).** Alleviation of chromium toxicity in maize by Fe fortification and chromium tolerant ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria. *Ecotoxicol Environ Saf*, 185:109706.
- **Desjardin, V. (2002).** Réduction du chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué. Th D. Institut national des sciences appliquées de Lyon.
- **Dhal, B., Thatoi, H. N., Das, N. N. & Pandey, B. D. (2013).** Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste. *J Hazard Mater*, 250-251:272-91.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

E

- **Ezzouhri L., Castro E. , Moya M., Espinola F.&Lairini K.(2009).**Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco African Journal of Microbiology Research Vol. 3 (2): 35-48.

F

- **Fathy, N. A., El-Wakeel, S. T. &Abd El-Latif, R. R. (2015).** Biosorption and desorption studies on chromium (VI) by novel biosorbents of raw rutin and rutin resin. Journal of Environmental Chemical Engineering,3(2).

G

- **GizawB. ; Alemu T. &Ebsa G.(2023).**Hexavalent chromium tolerant fungal species identified from urban vegetable farm and effluent waste in Addis Ababa & Rift valley, Ethiopia. World J Microbiol Biotechnol,39(3):81.
- **Glick, B.R. (2003).** Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. BiotechnologyAdvances. 21(5) :383-393.
- **Grady E.N., MacDonald J., Ho, M.T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon O., Renaud J. & Yuan Z., (2019).** Characterization and complete genome analysis of the surfactinproducing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. BMC Microbiology. 19(1):5-6.
- **GuezlaneTebibelN., Kahlouche B. &AthmaniGuemouri S., (2008).** Microbiologie, travaux pratiques. Office des publications universitaires : 62-72.
- **Gupta P., Kumar V., Usmani Z., Rani R., Chandra A. &Gupta V.K. (2019).** A comparative evaluation towards the potential of *Klebsiella* sp. and *Enterobacter* sp. in plant growth promotion, oxidative stress tolerance and chromium uptake in *Helianthus annuus* (L.). J. Hazard. Mater. 377:391–398.

J

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **J.O.R.A., (2006).** Journal Officiel de la République Algérienne. Décret ministériel n°06-141 du 19 avril 2006 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels.
- **Joutey, N. T., Sayel, H., Bahafid, W. & El Ghachtouli, N. (2015).** Mechanisms of Hexavalent Chromium Resistance and Removal by Microorganisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 233:45-69.

K

- **Karthik, C., Ramkumar, V. S., Pugazhendhi, A., Gopalakrishnan, K. & Arulselvi, P. I. (2017).** Biosorption and biotransformation of Cr (VI) by novel *Cellulosimicrobium funkei* strain AR6. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 17:0-0.

L

- **Legrouri, k., Khouya, E., Hannache, H., El Hartti, M., Ezzine, M. & Naslain, R. (2017).** Activated carbon from molasses efficiency for Cr (VI), Pb (II) and Cu (II) adsorption: A mechanistic study. *Chemistry International*, 3(3):301-310.
- **Lemboub, C. (2019).** Isolement et caractérisation des rhizobactéries piégées par la légumineuse *Lathyrus ochrus* L. cultivée sur substrat enrichi en minerai de fer, étude de leurs résistances aux métaux lourds et à la solubilisation des phosphates inorganiques. Th. D. Microbiologie appliquée, Université Badji Mokhtar, Annaba

M

- **Mamais, D., Noutsopoulos, C., Kavallari, I., Nyktari, E., Kaldis, A., Panousi, E., ... & Nasioka, M. (2016).** Biological groundwater treatment for chromium removal at low hexavalent chromium concentrations. *Chemosphere*, 152:238-244.
- **Maouchi S. & Medjdoub D. (2020)** .Etude bibliographique portant sur les environnements chauds, les microorganismes thermophiles et leurs applications. M2 Biotechnologie Microbienne. Univ Tizi ouzou.
- **Markad, U. S., Kalekar, A. M., Naik, D. B., Sharma, K. K. K., Kshirasagar, K. J., & Sharma, G. K. (2017).** Photo enhanced detoxification of chromium (VI) by formic acid using 3D palladium nanocatalyst. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 338.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Mishra, S., & Bharagava, R. N. (2016).** Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *Journal of Environmental Science and Health, Part C.* 34(1) :1-32.
- **Mohan, D. & Pittman, J. C. U. (2006).** Activated carbons and low-cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials,* 137(2):762-811.
- **Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (2003).** *Manual of Clinical Microbiology.* 8th Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

N

- **Neish, A. S. (2016).** Probiotics of the Acidophilus Group: *Lactobacillus acidophilus*, *delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *johnsonii*. In Floch, M. H., Ringel, Y., et Walker, W. A. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology, implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis.* Academic Press.
- **Nshimiyimana, J.B., Khadka, S., Mwirerwa, E.M., Akimana, N., Adhikari, S. & Nsabimana, A. (2018).** Thermophiles, isolation, characterization and screening for enzymatic activity. *Bioscience Discovery,* 9(3):430-437.

O

- **Oves, M., Khan, M. S. & Zaidi, A. (2013).** Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi Journal of Biological Sciences,* 20(2):121-129.

P

- **Patra, R. C. Malik, S., Beer, M., Megharaj, M. & Naidu, R. (2010).** Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. *Soil Biology & Biochemistry,* 42(10):1857-1863.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Priya, K. S., Roja, K., Priya, A. S., Sivasubramanian, A. & Muthuraman, M. S. (2013).** Detoxification and Bioremediation of Chromium (VI) From the Tannery Effluents. *International Journal of Chem Tech Research*, 5:2177-2185.
- **Puranik, P. R. & Paknikar, K. M. (1999).** Biosorption of lead, cadmium, and zinc by *Citrobacter* strain MCM B-181: Characterization Studies. *Biotechnology progress*, 15(2):228-237.

Q

- **Qambrani, N. A., Hwang, J. H. & Oh, S. E. (2016).** Comparison of chromium(III) and (VI) toxicities in water using sulfur-oxidizing bacterial bioassays. *Chemosphere*, 160:342-348.

R

- **Rahman, Z. & Singh, V. P. (2014).** Cr (VI) reduction by *Enterobacter* sp. DU17 isolated from the tannery waste dump site and characterization of the bacterium and the Cr (VI) reductase. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 91:97–103.
- **Rodier, J. (2009).** *L'analyse de l'eau*. 9ème édition, Dunod, Paris.
- **Ross, D.S., Sjogren R. E. & Bartlett R. J. (1981).** Behavior of chromium in soils, IV. Toxicity to microorganisms. *J. Environ. Qual.*, 10(2):145-148.

S

- **Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M., Valdez-Martínez, G. & Orozco-Mosqueda, M. C. (2015).** Induction of the homologous recombination system by hexavalent chromium in *Rhizobium etli*. *Microbiological Research*, 170.
- **Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., Dumat C. & Rashid M.I. (2017).** Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. *Chemosphere*, 178:513-533.
- **Sharma S & Adholeya A. (2011).** Detoxification and accumulation of chromium from tannery effluent and spent chrome effluent by *Paecilomyces lilacinus* fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65:309–317.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Sibi, G. (2016).** Biosorption of chromium from electroplating and galvanizing industrial effluents under extreme conditions using *Chlorella vulgaris*. *Green Energy & Environment*,1(2).

T

- **Thatheyus, A. J., &Ramya, D. (2016).** Biosorption of chromium using bacteria: an overview. *Sci. Inter*, 4(2):74-79.

U

- **Ullah, I., Nadeem, R., Iqbal, M.&Manzoor, Q. (2013).** Biosorption of chromium onto native and immobilized sugarcane bagasse waste biomass. *Ecological Engineering*,60:99-107.

V

- **Vendruscolo, F., Ferreira, G. L. R.&Filho, N. R. A. (2017).** Biosorption of hexavalent chromium by microorganisms. *International Biodeterioration Biodegradation*,119:87-95.
- **Vidali, M. (2001).** Bioremediation. *Pure and Applied Chemistry*,73 :1163-1172.
- **Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A.&Whitman, W. (Eds.). (2011).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 3: The Firmicutes. Springer Science & Business Media.

W

- **Wang, N., Kunz, J. L., Ivey, C. D., Ingersoll, C. G., Barnhart, M. C.&Glidewell, E. A. (2017).** Toxicity of Chromium (VI) to Two Mussels and an Amphipod in Water-Only Exposures with or without a Co-stressor of Elevated Temperature, Zinc, or Nitrate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(3):449-460.

Z

- **Zhang, J., Chen, S., Zhang, H.&Wang, X. (2017).** Removal behaviors and mechanisms of hexavalent chromium from aqueous solution by cephalosporin residue and derived chars. *Bioresource Technology*,238:484-491.