

3 REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
UNIVERSITE M'HAMEDBOUGARA DE BOUMERDES



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME DE MASTER II

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

Etude de la bioaccumulation des métaux lourds (Plomb et Argent) par deux souches halophiles F1 et F2

Présenté par :

Melle HADJAB IMENE

Melle BAHY FATMA

Mme DAAS SONIA

Soutenu devant le jury :

Mme MERAH O.

MCB (UMBB)

Président

Mme SADAOUY N.

MCA (UMBB)

Examinatrice

Mme SAYAH-SALMI A.

MAA (UMBB)

Promotrice

Mme KHEMILI-TALBI S.

PR (UMBB)

Co-promotrice

Année universitaire 2022 / 2023

Remerciement

Tout d'abord nous tenons à remercier Allah le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage pour réaliser ce modeste travail.

En préambule à ce mémoire nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Nous tenons d'abord à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance à Mm SAYAH Amna qui était à l'origine du choix de ce thème. Nous vous remercions pour votre gentillesse et spontanéité avec lesquelles vous avez dirigé ce travail, ainsi que pour votre disponibilité et vos conseils que grâce à eux nous avons pu améliorer notre travail.

Nous remercions notre Co-promotrice KHEMILI TALBI pour tout l'aide et le soutien qu'elle nous a apporté.

Nous remercions madame ANGAR.Y et madame AKMOUSI-TOUMI pour tout l'aide et les conseils qu'elles nous ont apporté.

Nous remercions Madame FERJOUNE.I et Madame Samia sans oublier madame Nadia qui sont gentilles avec nous

Ainsi mes enseignants, espérant que vous allez voir, dans ce manuscrit, les fruits du dévouement avec lequel vous avez fait preuve durant les enseignements que vous avez prodigués.

De peur d'en avoir oublié ; je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ce parcours universitaire.

Je tiens à remercier les membres du jury Mme MERAH O et Mme SADAOUI N. Pour leur présence, pour leur lecture attentive de ce mémoire, ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer notre travail.

Dédicace

Mes remerciements vont premièrement au Allah pour m'avoir accordé le courage, la capacité d'écrire et de réfléchir, la force de croire en moi-même et la patience de persévérer jusqu'à la fin de mes études.

A mon grand-père et ma grand-mère, que Dieu ait pitié d'eux et les accueille dans son immense paradis.

A mes chers parents, qui ont été à mes côtés dans les moments les plus difficiles de ce long périple, qui ont fait preuve d'une patience infinie en me guidant et en m'éduquant, et qui ont consenti d'innombrables sacrifices pour m'offrir une vie meilleure, que Dieu veille sur vous et vous protège pour moi.

A ma mère Khaira , qui a été toujours présente à mes côtés et m'a soutenu tout au long de ma vie, ainsi qu'à mon père Hamid, qui a consacré sa vie entière à me voir devenir la personne que je suis aujourd'hui.

A ma chère sœur SAMAH, qui m'a accompagnée, soutenue et aidée toute ma vie et tout au long de la réalisation de cette thèse, je t'aime beaucoup ma sœur.

A toute ma famille et à mes voisins, merci pour votre soutien infini.

A mon oncle Aissa et à ma tante Aicha, pour leur soutien indéfectible et leur amour inconditionnel tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

A mes précieuses amies, Roumeissa Merghit, Hadil Merghit , Ferial Benbouzid, Amani Fiak, Imen Doumi, Lamia Gacem et Lydia Bouheddi, Lyna Aberbache, Rima Amara et Y merci pour votre, amour infini votre présence à mes côtés tout au long de la réalisation de cette mémoire.

A mes binôme Hadjab Imene et Daas Sonia, merci pour votre soutien infinie et d'être restées à mes côtés dans les moments les plus difficiles que nous avons traversés pour accomplir ce mémoire.

A tous ceux qui me sont chers.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Fatma

Dédicace

Avec l'aide d'Allah le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie:

*A mon cher papa, **Mohammed** qui m'a appris le sens de travail et de la responsabilité, aucun langage ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*A mon amour et mon point faible et forte au même temps ma mère **Belhadi nadjwa** qui m'a soutenu et encouragé sans elle je ne suis rien, merci beaucoup mama et papa pour toutes les privations et sacrifices consentis, pour faire de moi une femme modèle*

*A mon frère **Amine** et mes sœurs **sara** et **amina** que j'aime Enormément, Vous m'avez soutenu, réconforté et encouragé,*

*A tante **Bahia** merci pour votre soutien infini*

A tous ceux qui m'ont nourri de leur savoir.

A ma binome bahi Fatma

*A mes aimables amies **hadjer, feriel, widad** et **kenza**, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

Et à toutes les personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail.



Imene

Dédicace

Je dédie ma mère Hassiba, la femme qui a été toujours là pour moi, la bougie qui éclair ma vie sans elle je ne peux pas vivre, merci pour votre soutien surtout pendant mes moments de faiblesse, merci de m'accompagner au cours de ces longues années d'études.

À mon père Saleh, l'homme le plus fort au monde, merci de m'avoir appris le sens du travail et de la responsabilité, merci de m'avoir soutenu et encouragé financièrement et mentalement, je te souhaite une vie plus longue à côté de moi.

Je dédie le triplet, ma sœur Lydia, mon frère Bilal et sa femme Kenza "ma 2ème sœur", les mots sont peu nombreux quand je parle de vous, vous êtes le sang. Je vous souhaite tout le succès et le bonheur dans votre vie personnelle et professionnelle.

Un grand merci à mon mari de m'avoir fait confiance et de m'apporter son soutien inconditionnel, Merci pour chaque fois que vous avez apprécié le stress de mes examens et décidé de me soutenir, le bon homme qui m'a encouragé tout le temps pendant ces deux derniers années aussi qui a été toujours là pour moi et pour notre ange, le plus cool fils au monde Racim.

Merci aux les meilleurs binômes, merci de m'avoir accompagné durant ce travail, plus du succès pour vous inchallah.

À mes chers Fatma Bahi et Katia Slimani qui ont m'a toujours motivé par ses paroles et ses conseils, vous êtes des fleurs au milieu des mauvaises herbes.

Un dédicace spécial À moi-même pour ma personnalité, mon parcours, surtout mon courage pour ne pas abandonner mes études au cours de mes difficiles moments.

Sonia

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1	Les environnements hypersalins -----	4
I.2	Les extrêmophiles -----	4
I.3	Les microorganismes halophiles -----	5
I.3.1	Définition -----	5
I.3.2	Classification -----	5
Les haloarchaeas -----	7	
Les bactéries halophiles -----	7	
Les Eucaryotes halophiles -----	7	
I.3.3	Mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles dans l'environnement hypersalin -----	8
I.3.4	Les mécanismes de résistance aux métaux lourds chez les procaryotes et leur présence chez les halophiles. -----	9
I.3.5	Biotechnologie des halophiles -----	10
I.4	Les Métaux Lourds -----	14
I.4.1	Définition -----	14
I.4.2	Les sources de pollution par les métaux lourds -----	16
I.4.2.1	L'activité anthropique -----	16
I.4.3	Propriétés des métaux lourds -----	16
I.4.4	Toxicité des métaux lourds -----	18
I.4.5	Effets des métaux lourds -----	19
I.4.5.3	Les effets des métaux lourds sur les microorganismes -----	19
I.4.6	Rôle des métaux lourds dans les processus biologiques -----	20
I.4.7	Résistance et accumulation de métaux -----	20
I.5	La bioremédiation -----	21
I.5.1	La pollution -----	21
I.5.2	Méthodes de traitement de la pollution -----	21
I.5.3	Définition Bioremédiation -----	22
I.5.4	Types de la bioremédiation -----	22
I.5.5	Mécanisme de bioremédiation -----	23

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1	Matériel	33
II.1.1	Matériel non biologique	33
II.1.2	Matériel biologique	33
II.2	Méthodes	34
II.2.1	Préparation de milieu SH	34
II.2.2	Revivification des souches halophiles F1 et F2	34
II.2.3	Vérification de la pureté des souches halophiles	35
II.2.4	Etude de l'effet des métaux lourds sur la croissance des souches F1 et F2	36
II.2.5	Suivi de la croissance cellulaire de la souche halophile F1 et F2 en présence des métaux étudiés	39
II.2.6	Mise en évidence de la production des biosurfactants	39
II.2.7	Etude de l'effet des métaux lourds testés sur la pigmentation des souches halophiles F1 et F2	40
II.2.8	Dosage du plomb et d'argent restants dans les surnagants des différentes cultures par la technique SAA	42

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1	Revivification et vérification de la pureté des souches halophiles extrêmes F1 et F2	44
III.2	Effet des métaux lourds (Pb et Ag) sur la croissance des souches F1 et F2	47
III.2.1	Suivi de la fermentation en batch des souches F1 et F2 en présence de plomb	47
III.2.2	Suivi de la fermentation en batch des souches F1 et F2 en présence d'argent	52
III.3	Bioaccumulation du plomb et d'argent par les cellules bactériennes halophiles	57
IV	Conclusion et perspective	
V	References bibliographique	

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

$(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: Acétate de plomb tri hydraté

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AgNO_3 : Nitrate d'argent

AgNPs: Synthesis of silver nanoparticles d'argent

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

ATPase : enzyme catalyse l'hydrolyse de l'ATP en l'ADP

BMBEAP : Biodiversité microbienne et biotechnologies des Ecosystèmes Aquatiques salins et pétroliers

CETIM : Centre Technique Des Industries Mécaniques

CMC : Concentration Micellaire Critique

CO_2 : dioxyde de carbone

DO : Densité optique

DSC: Dynamic Stability Control

E24 : test d'emulsification

EDX: Energy Dispersive X-ray

Fe^{2+} : l'ion ferreux (état d'oxydation+II)

Fe^{3+} : l'ion ferreux (état d'oxydation + III)

FTIR: Fourier Transform Infra Red

GPC: Gel Permeation Chromatography

HCL : acide chlorhydrique

$\text{Hg}(0)$: mercure métallique

$\text{Hg}(\text{II})$: Sulfure de mercure

IFT : Indicateur de Fréquence de Traitement

KCl : chlorure de potassium

La protéine G : protéine de liaison aux nucléotides de guanine

LPS : lipopolysaccharides

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

Pb : plombe

Pb(CH₃COO)₂: acétate de plomb

Pb⁺² : l'ion de plomb (état d'oxydation + II)

Ph : potentiel hydrogène

PHA : Polyhydroxyalcanoates

Pi : phosphate inorganique

PKa : Constant d'acidité

Ppm : partie par million

Rpm : round par minute or tour par minute

SAA : Atomic absorption spectroscopy

SMP1: Silane modified polymer

U : uranium

UMBB : University M'hamedBougara Boumerdes

UV : Rayon Ultraviolet

VITAMINE A : Axérophtol o acide rétinoïque

Liste des figures

Figure 1 : Répartition des halophiles au sein des trois domaines du vivant. Les groupes annotés en rouge contiennent au moins un halophile -----	6
Figure 2: Classification périodique des éléments -----	15
Figure 3: La relation entre les performances de la personne et la concentration de l'élément essentiel dans le régime alimentaire -----	18
Figure 4: Différents mécanismes impliqués dans l'élimination des métaux lourds par les bactéries en milieu liquide. -----	23
Figure 5: Illustration du passage intracellulaire des métaux lourds par différents canaux et de leur bioaccumulation dans la cellule bactérienne par différents mécanisme -----	30
Figure 6: Aspect de milieu SH liquide. -----	34
Figure 7 : Protocole d'extraction des pigments membranaires -----	41
Figure 8: Aspects des cultures des souches halophiles extrêmes F1 et F2 après 7 jours d'incubation sur milieu SH standard. -----	44
Figure 9 : Aspect macroscopique des souches halophiles F1 et F2 après incubation sur milieu SH standard solide. -----	45
Figure 10 : Aspect microscopique des souches halophiles extrêmes F1 et F2 Gx40. -----	46
Figure 11 : Aspect microscopique des souches halophiles extrêmes F1 et F2 après coloration du Gram modifié GX40. -----	46
Figure 12 : Cinétique de croissance de la souche F1 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence de différentes concentrations du plomb (ppm) à 40°C à 150 rpm pendant 15 jours d'incubation. -----	48
Figure 13: Cinétique de croissance de la souche F2 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence de différentes concentrations du plomb (ppm) à 40°C à 150 rpm pendant 15 jours d'incubation. -----	48
Figure 14: Résultats de l'index d'émulsification (E24) en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à différentes concentrations pour la souche F1. -----	49
Figure 15 : Aspect des émulsions formées en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à différentes concentrations pour la souche F1. -----	49
Figure 16: Résultats de l'index d'émulsification (E24) en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à différentes concentrations pour la souche F2. -----	50
Figure 17: Aspect des émulsions formées en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à différentes concentrations pour la souche F2. -----	50
Figure 18 : Cinétique de croissance de la souche F1 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence de différentes concentrations d' AgNO_3 (ppm) à 40°C à 150 rpm pendant 15 jours d'incubation. -----	52
Figure 19: Cinétique de croissance de la souche F2 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence de différentes concentrations d' AgNO_3 (ppm) à 40°C à 150 rpm pendant 15 jours d'incubation. -----	53
Figure 20: Résultats de l'index d'émulsification (E24) en présence d' AgNO_3 à différentes concentrations pour la souche F1. -----	54
Figure 21 : Aspect des émulsions formées en présence d' AgNO_3 à différentes concentrations pour la souche F1. -----	54
Figure 22 : Résultats de l'index d'émulsification (E24) en présence d' AgNO_3 à différentes concentrations pour la souche F2. -----	55
Figure 23 : Aspect des émulsions formées en présence d' AgNO_3 à différentes concentrations pour la souche F2. -----	55
Figure 24. Aspect de la culture avec argent -----	58
Figure 25 aspect de témoin avec 6ppm -----	59

Liste des tableaux

Tableau 1: Radicaux liant les métaux présents dans la structure des cellules bactériennes.	24
Tableau 2: Mesures effectuées pour la préparation des solutions mères.	37
Tableau 3: Concentrations des métaux lourds testés dans les pré-cultures des deux souches halophile F1 et F2.	37
Tableau 4: Mesures effectuées pour la préparation des pré-cultures des souches halophiles F1 et F2 en présence des métaux lourds testés.	38
Tableau 5: Résultats des caractères macroscopiques des souches halophiles F1 et F2	45
Tableau 6 : Valeurs d'absorbance (Abs) du balayage spectral entre 200 à 700 nm des pigments produits par la souche halophile F1 en absence et en présence des différentes concentration de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\lambda =$ longueur d'onde (nm).	51
Tableau 7 : Valeurs d'absorbance (Abs) du balayage spectral entre 200 à 700 nm des pigments produits par la souche halophile F2 en absence et en présence des différentes concentration de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\lambda =$ longueur d'onde (nm).	51
Tableau 8 : Valeurs d'absorbance (Abs) du balayage spectral entre 200 à 700 nm des pigments produits par la souche halophile F1 en absence et en présence des différentes concentration d' AgNO_3 , $\lambda =$ longueur d'onde (nm).	56
Tableau 9 : Valeurs d'absorbance (Abs) du balayage spectral entre 200 à 700 nm des pigments produits par la souche halophile F2 en absence et en présence des différentes concentration d' AgNO_3 , $\lambda =$ longueur d'onde (nm).	56
Tableau 10 : Résultats de bioaccumulation de plomb et d'argent par la souche halophile F1 et F2 à partir du surnageant des cultures par la technique SAA utilisée par le laboratoire de CETIM.	57

Introduction

Introduction

Au cours des deux dernières décennies, une attention particulière a été accordée à la gestion de la pollution de l'environnement et à son contrôle dû aux matières dangereuses. Les métaux lourds, tels que le plomb et l'argent, sont des éléments omniprésents dans notre environnement, souvent libérés par des activités humaines telles que l'industrie minière, la production de batteries et la pollution atmosphérique. Leur présence accrue dans les écosystèmes aquatiques et terrestres peut avoir des conséquences dévastatrices sur la biodiversité et la santé humaine. La décontamination des métaux lourds dans le sol et l'eau autour des installations industrielles est un défi depuis longtemps (**Umrانيا, 2006**).

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour la remédiation des métaux lourds, parmi lesquelles les méthodes physico-chimiques (conventionnelles) telles que l'échange d'ions, les techniques électrochimiques d'oxydoréduction, la filtration sur membrane et la précipitation. Les inconvénients des méthodes conventionnelles sont l'incapacité de ces méthodes à détoxifier les métaux lourds de façon permanente (**Sun et al., 2020**), en plus du coût de l'efficacité et des sous-produits dangereux produits par le processus d'élimination. Cependant, la méthode conventionnelle est considérée comme efficace pour les grandes zones contaminées par de faibles quantités de métaux lourds et pour les zones locales fortement polluées (**Abo-Alkasem et al., 2023**).

La construction d'une nouvelle technologie qui met l'accent sur l'élimination complète des métaux lourds représente un défi pour les scientifiques, l'utilisation de la bioremédiation est devenue plus courante et elle est généralement considérée comme prometteuse en raison de ses nombreux avantages. De nombreux micro-organismes, notamment des bactéries, des actinomycètes, des champignons, des levures et des algues, peuvent être utilisés dans la bioremédiation des métaux lourds du sol et de l'eau (**Abo-Alkasem et al., 2023**).

Parmi les diverses stratégies de bioremédiation, l'utilisation de bactéries halophiles, des micro-organismes adaptés aux environnements salins, se révèle prometteuse. La présence des métaux lourds stimule les microorganismes à développer des mécanismes de résistance et d'adaptation à ces environnements. L'accumulation des métaux lourds par les halophiles affecte leur croissance et leur pigmentation.

Cette recherche explore : les capacités des souches halophiles à détoxifier les métaux lourds dans des milieux salins, ouvrant ainsi la voie à des solutions novatrices pour atténuer

les impacts des polluants métalliques dans notre environnement, ainsi les effets des métaux lourds sur ces souches halophiles.

Dans cette étude, nous avons testé deux souches halophiles sous l'appellation « F1 et F2 », en présence de deux métaux lourds, pour cela nous avons fait :

- Une revivification et vérification de la pureté des souches F1 et F2.
- Un suivi de la croissance bactérienne des deux souches en présence du plomb et d'argent.
- Une extraction des pigments pour déterminer l'effet des métaux lourds sur la pigmentation des bactéries.
- Des mesures des biosurfactants produits en présence des métaux lourds.
- Réalisation de la technique de spectrophotomètre d'absorption atomique SAA pour étudier la bioaccumulation du plomb et d'argent par les cellules bactériennes halophiles étudiées.

Notre mémoire est structuré en trois chapitres principales : Le premier chapitre englobe une synthèse bibliographique, abordant des généralités sur les halophiles, leurs mécanismes variés, les métaux lourds, ainsi que le processus de bioremédiation. Le deuxième chapitre détaille le matériel et les méthodes utilisés pour mener à bien notre étude. Le troisième chapitre expose les résultats obtenus et les discussions qui les accompagnent. Enfin, nous concluons par une synthèse générale et des perspectives.

Synthèse
Bibliographique

I Synthèse bibliographique

I.1 Les environnements hypersalins

Les environnements extrêmes sont abondants à travers notre planète. Par exemple, environ 70% de la biosphère fait face à une forte pression (Picard & Daniel, 2013), incluant des écosystèmes froids dans l'Arctique et l'Antarctique, des déserts très arides comme le Sahara en Afrique du Nord, des volcans, des fosses océaniques profondes, des lacs hypersalins, des sources hydrothermales, et d'autres. Les "environnements hypersalins" désignent ceux où la concentration de sel dépasse celle de l'eau de mer (environ 3,5% en poids/volume dans l'eau de mer contre jusqu'à 35% en poids/volume dans les saumures). On trouve ces environnements dans des écosystèmes tels que les lacs intérieurs, les lagunes, les salines, les marais ou les étangs salés côtiers/intérieurs. Ils sont relativement répandus dans des pays comme les États-Unis d'Amérique, le Mozambique, l'Algérie, l'Espagne ou le Canada (McGenity & Sorokin, 2010).

Ces environnements abritent la majorité de la biomasse terrestre (Acerbi *et al.*, 2017), avec une grande diversité de vie connue sous le nom d'Extrêmophiles, qui peuvent survivre et se développer dans des conditions anormales dans un ou plusieurs paramètres.

I.2 Les extrêmophiles

La vie sur Terre a émergé et prospéré dans des conditions extrêmes primitives telles que l'acidité, l'alcalinité, les températures basses ou élevées, les altitudes élevées, la salinité élevée, les pressions élevées, etc. Selon le type d'environnement dans lequel ils vivent, Six grandes catégories d'extrêmophiles sont reconnues :

(i) **Les thermophiles** sont des organismes qui nécessitent des températures de croissance optimales de 50 °C ou plus, voire entre 80°C et 110°C dans le cas des hyperthermophiles.

(ii) **Les halophiles** sont des organismes qui ont besoin d'une concentration saline de 3 % à 30 % pour leur développement.

(iii) **Les psychrophiles** sont des organismes qui dépendent de températures de croissance optimales de 15 °C ou moins et qui ne peuvent pas se développer au-dessus de 20 °C.

(iv) **Les alcaliphiles** se développent dans des environnements ayant un pH supérieur à 10.

(v) Les **acidophiles** sont des organismes dont la croissance optimale se situe à un pH égal ou inférieur à 2.

(vi) Les **piézophiles** ou barophiles prospèrent dans des environnements soumis à une pression hydrostatique élevée (Durvasula & Rao, 2018).

Parmi ces extrémophiles, on retrouve les halophiles, des organismes qui nécessitent du sel pour leur croissance et pour maintenir leur intégrité cellulaire. Ces microorganismes peuvent prospérer dans des environnements salins où la plupart des autres organismes ont du mal à se développer. Le sel joue un rôle essentiel dans leur survie et leur développement, ce qui les distingue des autres formes de vie (Kanekar & Kanekar, 2022b)

I.3 Les microorganismes halophiles

I.3.1 Définition

Sont des microorganismes qui aiment le sel et vivent dans des environnements salins, et ils se développent de manière optimale en présence de 3 à 30 % de NaCl. Ils comprennent principalement des microorganismes procaryotes et eucaryotes ayant la capacité d'équilibrer la pression osmotique de l'environnement et de résister aux effets de dénaturation des sels. Les halophiles ont été identifiés dans des sédiments marins situés jusqu'à 1922 mètres sous le fond marin (Inagaki *et al.*, 2015; Ismail *et al.*, 2014). Ces microorganismes ont été trouvés à jouer un rôle essentiel dans les processus bioénergétiques du sol (Vera-Gargallo & Ventosa, 2018) ainsi que dans la conservation des aliments (Gibtanet *et al.*, 2017; Henrietet *et al.*, 2014). De manière remarquable, on les a également détectés dans le microbiote intestinal humain (Landrigan *et al.*, 2018). Il existe des halophiles aérobies et anaérobies, hétérotrophes, phototrophes et chimio-autotrophes (Elevi Bardavid *et al.*, 2008).

I.3.2 Classification

Différentes classifications ont été suggérées pour caractériser ces microbes en fonction de leur capacité à tolérer la salinité. Les définitions pour les halophiles ont été formulées par Donn Kushner (1978), qui a proposé différentes catégories (Manirethan *et al.*, 2018).

Kushner et Kamekura (1988) ont proposé le schéma le plus largement utilisé, pour classer les micro-organismes halophiles en fonction de leurs besoins et de leur tolérance au sel (Edbeib *et al.*, 2016) :

➤ **Les haloarchaeas**

Les archées halophiles, également appelées haloarchaeas sont considérées comme des halophiles obligatoires (**Martijn et al., 2020**), qui se développent dans des écosystèmes modérément à extrêmement salins tels que les roches salines, les lacs de soude hypersalins, les marais salants marins, les sédiments et les saumures (**Andrei et al., 2012**) sont des espèces aérobies ou anaérobies facultatives, pigmentées en rouge, qui se développent dans des conditions extrêmement halophiles (1,5 à 5,0 M de NaCl), à la saturation ou près de la saturation en NaCl (**Sankhla et al., 2016**), et la plupart des espèces nécessitent 2 à 4 M de NaCl (**Mazguene et al., 2018; Qin et al., 2014; Uzoma et al., 2015**).

De plus, les formes cellulaires des haloarchaeas sont très diverses et peuvent être observées sous des formes simples telles que des bâtonnets, des cocci ou des disques, ou sous des formes plus inhabituelles comme des triangles, des carrés ou des formes pléomorphes (**Amoozegar et al., 2017**).

➤ **Les bactéries halophiles**

Les bactéries halophiles présentent une grande diversité de tailles et de formes et vivent dans des conditions de stress salin variables (**Rajendran, 2015**). Ces espèces bactériennes peuvent être aérobies, anaérobies, chimio hétérotrophes, photo hétérotrophes et/ou photo autotrophes (**Edbeib et al., 2016**).

Contrairement aux archées halophiles, les espèces bactériennes découvertes sont réparties dans de nombreuses branches phylogénétiques différentes, et elles peuvent être modérément ou extrêmement halophiles. Le domaine Bactéries comprend de nombreux organismes halophiles et halotolérants qui se diffusent dans différents taxons bactériens, et les vrais halophiles sont bien connus dans le phylum (**Hozzein, 2015**).

➤ **Les Eucaryotes halophiles**

Les écosystèmes hypersalins abritent une grande variété de microorganismes où les eucaryotes microbiens peuvent s'adapter et survivre (**Cantrell et al., 2006**). Cependant, curieusement, ces genres ont reçu beaucoup moins d'attention et ont souvent été traités de manière simpliste, ce qui rend difficile la compréhension de leur diversité par rapport aux bactéries et aux archées halophiles (**Harding et al., 2017; Harding & Simpson, 2018; Park**

& Simpson, 2015). Les Eucaryotes halophiles les mieux connus sont les protistes (protozoaires) et plusieurs catégories d'algues et de champignons.

I.3.3 Mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles dans l'environnement hypersalin

Les extrémophiles utilisent différentes stratégies pour adapter leurs membranes et leurs protéines membranaires aux différentes conditions extrêmes dans lesquelles ils se développent. De plus, ils sont capables d'adapter les propriétés de leurs membranes cytoplasmiques en réponse aux changements dans l'écosystème en variant les compositions lipidiques (Albers *et al.*, 2001).

Les halophiles possèdent la remarquable capacité d'équilibrer la pression osmotique de leur environnement, ce qui leur permet de résister aux effets dénaturants du sel. Cette adaptation spécifique leur confère des caractéristiques biologiques et écophysologiques particulières (DaSarma & Arora, 2002; Elevi Bardavid *et al.*, 2008; Nayak *et al.*, 2012).

Ces halophiles dépendent de deux stratégies de base : la première est la stratégie du "sel à l'intérieur" en accumulant du sel à l'intérieur de la cellule, et la deuxième est la stratégie du "sel à l'extérieur" en accumulant des concentrations élevées de solutés compatibles, qui jouent un rôle important dans l'adaptation aux conditions salines (Raval *et al.*, 2018).

L'accumulation d'ions inorganiques

Principalement KCl pour équilibrer la pression osmotique (Yin *et al.*, 2015). L'accumulation de potassium et de chlorure à l'intérieur du cytoplasme aide la machinerie cellulaire à éviter la perte d'eau vers l'environnement (Jehlicka *et al.*, 2012) (Gohel *et al.* 2018 ; Oren 2012). Cela permet l'équilibration du sel lorsque l'environnement est saturé de NaCl, empêchant ainsi le choc osmotique (Delgado-García *et al.*, 2012).

Seuls quelques groupes d'halophiles utilisent du sel (principalement KCl) pour maintenir l'équilibre osmotique avec le milieu extérieur (Quillaguamán *et al.*, 2010).

Stratégie de synthèse et d'accumulation d'osmolytes (stratégie de faible apport en sel)

Repose sur l'accumulation de concentrations élevées de solutés organiques compatibles, permettant ainsi de maintenir un cytoplasme iso-osmotique ou légèrement hyper osmotique

par rapport à son environnement (**Mesbah *et al.* 2014**). De plus, les composés organiques qui sont osmotiquement actifs, de faible poids moléculaire et hautement solubles dans l'eau, sont soit captés par l'environnement par des mécanismes de transport spécifiques, soit synthétisés par l'organisme en tant que stratégie pour prévenir la dénaturation des protéines par un excès de sel (précipitation des protéines) à proximité de la cellule.

Ce système d'ajustement comprend la biosynthèse et l'accumulation intracellulaire de solutés organiques non chargés et hautement solubles dans l'eau, qui réduisent l'activité thermodynamique de l'eau afin de compenser la pression osmotique externe (**Oren *et al.*, 2002**).

De plus, l'accumulation de solutés compatibles peut se produire par biosynthèse de novo, à partir de matériaux de stockage ou par absorption du milieu environnant (**Kumar *et al.*, 2014**). Ces solutés ont pour fonction d'équilibrer la pression osmotique interne avec la pression osmotique externe pour maintenir l'intégrité cellulaire ; ils peuvent être des ions inorganiques tels que le potassium (**Delgado-García *et al.*, 2012**) ou des molécules organiques (**Gohel *et al.*, 2018**). En général, il existe une grande variété de ces solutés organiques osmotiques ; par exemple, l'algue unicellulaire halotolérante *Dunaliella salina* utilise le glycérol, les cyanobactéries halophiles produisent du glucosyl-glycérol ou de la bêtaïne glycine, et de nombreuses bactéries hétérotrophes synthétisent de l'ectoïne, de l'hydroxyectoïne, d'autres acides aminés et dérivés (proline, acide glutamique, glutamine, glycine), des sucres simples et des dérivés de sucres (sucrose, tréhalose, glucosyl-glycérol). De plus, un grand nombre de bactéries anoxygéniques phototrophes sont capables de produire de la bêtaïne glycine (**Oren, 2006**).

I.3.4 Les mécanismes de résistance aux métaux lourds chez les procaryotes et leur présence chez les halophiles.

La résistance aux métaux chez les bactéries et les archées peut être obtenue par des mécanismes passifs tels que la séquestration de métaux extracellulaires ou intracellulaires, ainsi que par des mécanismes actifs tels qu'un efflux métal-spécifique intensifié, parallèlement à la répression de l'absorption et de la détoxification enzymatique par réduction et/ou volatilisation d'ions métalliques (**Nies, 1999**).

Outre les mécanismes constitutifs, des réponses génomiques induisibles aux niveaux de stress élevés causés par les métaux lourds ont été observées. Des ajustements transcriptionnels

systémiques à court et long terme visent à réduire l'absorption des métaux et à diminuer leur toxicité subséquente. Par exemple, chez *Halobacterium* NRC-1, une réponse transcriptionnelle rapide a été observée, avec plus de 20 % des 2400 gènes traduits dans les 25 minutes suivant une exposition soudaine à un métal toxique (comme le Fe²⁺ à des niveaux élevés), illustrant d'importants ajustements physiologiques pour maintenir l'homéostasie (**Kaur *et al.*, 2006**). Généralement, ces réponses sont temporaires et, lorsque les micro-organismes s'adaptent aux métaux présents dans leur environnement, les niveaux de transcription des gènes codant pour la réponse initiale reviennent à des valeurs normales (**Srivastava & Kowshik, 2013**).

I.3.5 Biotechnologie des halophiles

La biotechnologie a une grande valeur dans de nombreux domaines, que ce soit dans l'industrie ou dans notre vie quotidienne. Les bactéries et les archées extrêmement halophiles sont particulièrement intéressantes car elles sont reconnues pour leur capacité à produire des composés d'intérêt industriel et des produits biotechnologiques variés tels que des biopolymères, des exopolysaccharides, des hydrolases, des amylases, des cellulases, des protéases et des lipases (**Hedi *et al.*, 2014**). De plus, elles sont capables de fournir des composés organiques tels que des antimicrobiens et des enzymes, qui restent actives même dans des conditions salines. Ces micro-organismes peuvent également produire des pigments, des solutés compatibles qui agissent comme des protecteurs contre le stress, ainsi que des lipides hautement stables et actifs dans des conditions extrêmes (**Quadri *et al.*, 2016**). Leur utilisation dans la bioremédiation des eaux usées salines est également envisageable (**Rodriguez-Valera, 1992**). En somme, les halophiles offrent un éventail d'applications potentielles dans le domaine de la biotechnologie et représentent une ressource précieuse pour le développement de technologies innovantes.

I.3.5.1 Enzymes des halophiles

Les microorganismes halophiles sont connus pour leur capacité à produire des enzymes stables, dont beaucoup sont polyextrémophiles, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour des applications biotechnologiques variées. Les possibilités d'utilisation des extrémotymes (enzymes extrémophiles) ont été examinées de manière approfondie par **Gomes et Steiner (2004)**. Les enzymes issues des halophiles ont été mises à profit dans l'industrie alimentaire, les détergents à lessive et l'industrie textile (**Setati, 2010**).

DasSarma et DasSarma (2015) ont fourni des informations à jour sur les enzymes halophiles qui fonctionnent à des niveaux de salinité très élevés. Des analyses génomiques et structurales ont révélé que les enzymes des archées et des bactéries halophiles présentent une charge négative due à un excès de résidus acides par rapport aux résidus basiques, ainsi qu'une hydrophobicité modifiée, leur permettant de fonctionner dans des environnements à faible activité de l'eau. Cela confère aux enzymes halophiles leur stabilité et leur solubilité dans de telles conditions, les rendant utiles dans les processus industriels impliquant des solvants organiques.

Dans une autre revue, **Waditee-Sirisattha et al. (2016)** ont exploré les populations microbiennes diverses des environnements hypersalins. Les halophiles hébergent des composés bioactifs, des solutés compatibles et des enzymes hydrolytiques novatrices. Les auteurs ont également discuté des applications biotechnologiques prometteuses de ces biomolécules intéressantes.

I.3.5.2 Enzymes hydrolytique

Les enzymes hydrolytiques sont utiles dans diverses applications analytiques et industrielles. Elles convertissent les molécules chimiques en acceptant des molécules d'eau comme substrat. Les microbes halophiles synthétisent naturellement ces enzymes. Les protéases et les amylases sont des enzymes commercialement importantes qui jouent un rôle essentiel dans les applications biotechnologiques.

Les souches archéennes halophiles sont également examinées dans la production d'enzymes hydrolytiques telles que les estérases, les kératinases, les lipases, les amylases, les cellulases, les protéases et les pectinases.

Kératinase

Les enzymes kératinolytiques ont suscité plus d'attention ces dernières années car elles peuvent hydrolyser des substrats kératinolytiques insolubles. La kératinase est utilisée dans la plupart des secteurs de la biotechnologie (aliments pour animaux, biofertilisants, détergents et programmes biochimiques (**Gupta,Ret al.,2013**))

Amylase

L'amylase est utilisée comme adjuvant pharmaceutique pour traiter les problèmes digestifs. Elle est également utilisée dans diverses industries telles que l'agroalimentaire, le textile, les détergents, le papier et les produits chimiques. (ahoo .S., Roy S., Maiti S., (2016)

Protéase

Les protéases sont utilisées dans les industries médicales, des détergents et de la transformation des aliments (Rai *et al.*, 2016). Les bactéries halotolérantes sont impliquées dans la synthèse de l'enzyme protéase. La production de protéase à l'échelle industrielle présente des défis de contamination importante et de coût élevé. Les bactéries halophiles sont utilisées pour éviter la contamination pendant le processus de fermentation et sont également impliquées dans la synthèse de peptides.

Cellulase

La cellulase agit comme un catalyseur dans l'hydrolyse des liaisons β -1, 4 de la cellulose pour fournir des sous-unités monomères d'importance industrielle. La cellulase trouve des applications dans l'industrie de la pâte et du papier, de la lessive, de l'alimentation animale, de l'industrie textile, de la brasserie et de la production de biocarburants. Elle est principalement utilisée dans la biocatalyse des solvants organiques (Garg *et al.*, 2016).

I.3.5.3 Production de pigments

Les caroténoïdes sont l'un des pigments cruciaux qui ont attiré l'attention en raison de leurs caractéristiques uniques. Ils contiennent une grande quantité de vitamine A. Les bactéries, les archées et les algues halophiles produisent des caroténoïdes lorsqu'ils sont cultivés en laboratoire. Ce pigment est utilisé comme alimentation animale, colorant alimentaire, complément alimentaire et antioxydant dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Brassard *et al.*, 2017).

I.3.5.4 Production de bioplastiques; Polyhydroxyalcanoates (PHA)

Au cours des deux dernières décennies, le plastique est devenu un important polluant environnemental, ce qui a conduit à son interdiction dans de nombreux pays. Les déchets plastiques créent de nombreux problèmes dans l'environnement. Il y a eu une amélioration considérable ces dernières années dans la fabrication de plastiques biodégradables.

Il est communément connu sous le nom de polyhydroxyalcanoate et est accumulé de manière intracellulaire sous forme de granules par les eubactéries ainsi que les archées en tant que réserves de carbone et d'énergie. Le plastique biodégradable est un polyester d'hydroxyacides appelé polyhydroxyalcanoate ou PHA (Kanekar & Kanekar, 2022a).

Halomonas nitroreducens est une bactérie halophile qui produit un polymère selon les résultats d'études utilisant des techniques spectroscopiques FTIR, DSC, GPC et EDX. Elle accumule des polyhydroxyalcanoates pendant la production de polymères. Le genre *Halomonas*, notamment l'espèce *Marinobacter*, a montré une forte production d'exopolymères.

I.3.5.5 Biosurfactants

Les biosurfactants sont un groupe diversifié de molécules tensioactives synthétisées par des micro-organismes. Comparés aux tensioactifs chimiques, les biosurfactants présentent des propriétés uniques telles qu'une faible toxicité, une concentration micellaire critique (CMC) plus basse et une plus grande sélectivité (Wang *et al.*, 2019). Les biosurfactants produits in situ par les micro-organismes peuvent réduire la tension interfaciale entre l'huile et l'eau (IFT), modifier la mouillabilité du substrat et favoriser la libération d'huile dans les milieux poreux. De plus, les biosurfactants peuvent faciliter la formation d'émulsions huile-dans-eau, améliorant ainsi la biodégradation des hydrocarbures présents dans l'eau produite.

Les microorganismes halophiles, lorsqu'ils sont soumis à un traitement, montrent une activité plus élevée à pH élevé, température élevée et concentration de sel élevée. Ils ont la capacité de dégrader les composés organiques et de les convertir en nutriments grâce à des enzymes hydrolytiques.

I.3.5.6 Biotechnologie alimentaire

Les halophiles sont impliqués dans des méthodes anciennes de production de sel solaire à partir d'eau de mer. Ils sont également utilisés dans la production de quelques produits alimentaires fermentés traditionnels avec l'aide de bactéries fermentatives halophiles. Parmi les exemples de produits alimentaires fermentés figurent le "jeotgal", un produit marin fermenté coréen populaire, le "fugunokonukazuke", un aliment japonais préparé par fermentation des ovaires de poisson-globe salés dans le son de riz, et le "nam-pla", une sauce de poisson thaïlandaise. Les bactéries fermentatives halophiles sont utilisées pour la fermentation de poissons et de crevettes. Elles sont également utilisées dans la production de

compléments alimentaires tels que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne. *Halalkalicoccusjeotgali* est une souche isolée à partir de crevettes "jeotgal".(Thongthai *et al.*,1992).

I.3.5.7 Biodégradation

Les bactéries fermentatives anaérobies halophiles ont le potentiel d'être utilisées dans le traitement anaérobie des eaux usées salines. Ces microorganismes sont utilisés pour dégrader les métaux lourds et les composés organiques. *H. praevalens* et *O. marismortui* sont des bactéries fermentatives halophiles utilisées dans la biodégradation du nitrobenzène, de l'o-nitrophénol, du m-nitrophénol et du p-nitrophénol qui produisent d'excellents résultats en 24 heures.

I.3.5.8 Autres application biotechnologiques

D'autres applications biotechnologiques des halophiles ont été mises en évidence par **Amoozegar *et al.* (2019)** dans le domaine de la production de biocarburants. Les activités microbiennes jouent un rôle clé dans la dégradation de substrats tels que les sucres, l'amidon, les déchets agricoles et animaux. De nombreux processus de production industrielle se déroulent en présence de concentrations élevées de Na Cl. C'est pourquoi l'attention se porte sur les halophiles en vue de leur utilisation dans la production de biocarburants. **Corral *et al.* (2020)** ont effectué une revue des recherches sur les molécules produites par les microorganismes halophiles présentant une activité antimicrobienne et anticancéreuse. Les mécanismes d'action de ces molécules sont discutés. **Aljohny (2015)** a passé en revue les recherches sur les bactéries halophiles et halotolérantes, ainsi que sur leurs enzymes et autres applications biotechnologiques. **Thombre *et al.* (2017)** ont décrit les applications pharmaceutiques et biotechnologiques des halophiles.

I.4 Les Métaux Lourds

I.4.1 Définition

Selon **Jessica Briffa *et al.***, La définition du terme "métaux lourds" fait l'objet d'un débat permanent du terme "métaux lourds". Ils sont définis comme des métaux lourds soit en raison de leur poids atomique élevé, soit en raison de leur densité élevée. De nos jours, le terme "métal lourd" est utilisé pour décrire les éléments chimiques métalliques et les métalloïdes qui sont toxiques pour l'environnement et l'homme. Certains métalloïdes ainsi que des métaux

plus légers tels que le sélénium, l'arsenic et l'aluminium sont toxiques. Ils sont appelés métaux lourds, mais certains d'entre eux ne sont généralement pas toxiques, comme l'or.

Bloc S												Bloc p					
H		■ Métaux lourds de densité > 5															He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	Bloc d										Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Te	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Bloc f														
Lanthanides			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
Transuraniens			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Cf	Bk	Es	Fm	Md	No	Lr	

Figure 2: Classification périodique des éléments(Fourest, 1993)

- Voici une liste de métaux lourds selon leur densité, qui est supérieure à 5 g/cm³ et qui sont les plus courants dans notre vie quotidienne sont :**(Briffa et al., 2020)**
 - Titane
 - Chrome
 - Manganèse
 - Fer
 - Cobalt
 - Nickel
 - Cuivre
 - Zinc
 - Arsenic
 - Molybdène
 - Argent
 - Cadmium
 - Etain
 - Or
 - Mercure
 - Plomb

I.4.2 Les sources de pollution par les métaux lourds

Ces métaux lourds sont naturellement présents dans la croûte terrestre depuis la formation de la terre. L'augmentation alarmante de l'utilisation des métaux a conduit à une concentration imminente des espèces métalliques dans les environnements terrestres et aquatiques. La pollution par les métaux lourds est due à : **(Briffa *et al.*, 2020)**

I.4.2.1 L'activité anthropique

L'activité anthropique qui est la principale cause de la pollution, principalement en raison de l'extraction du métal, la fusion, les fonderies et d'autres industries basées sur les métaux, la lixiviation de métaux provenant de différentes sources telles que les décharges, les dépotoirs, les excréments, les bétails et les fumiers de poulet, les ruissellements d'eau, les automobiles et les travaux routiers. L'utilisation de métaux lourds dans l'agriculture a été la source secondaire de la pollution par les métaux lourds, comme l'utilisation de pesticides, les insecticides, engrais, etc. **(Briffa *et al.*, 2020)**.

I.4.2.2 Des causes naturelles

Peuvent également accroître la pollution par les métaux lourds, comme l'activité volcanique, la corrosion des métaux, l'évaporation des métaux du sol et de l'eau et la remise en suspension des sédiments, l'érosion des sols, l'altération géologique **(Briffa *et al.*, 2020)**.

I.4.3 Propriétés des métaux lourds

Selon **Jessica Briffa *et al.*** ;

Les métalloïdes ont tendance à former des liaisons covalentes, ce qui leur confère des propriétés toxicologiques. Les deux conséquences les plus importantes de cette propriété sont qu'ils peuvent se lier de manière covalente avec des groupes organiques. Ils forment ainsi des ions et des composés lipophiles, et ils peuvent avoir des effets toxiques lorsqu'ils se lient à des éléments non métalliques des macromolécules cellulaires.

En raison de devenir lipophile, la distribution des métalloïdes dans la biosphère et leur réponse toxique varient de l'action des formes ioniques simples du même élément.

Exemples

1. L'oxyde de tributylétain et les formes méthylées de l'arsenic, qui sont hautement toxiques, sont des exemples de composés lipophiles.
2. La liaison du plomb et du mercure aux groupes sulfhydryles de la protéine est un exemple de liaison à des éléments non métalliques.

Les métaux lourds peuvent pénétrer dans l'organisme humain de quatre manières

- Par ingestion d'aliments contaminés,
- Par inhalation de l'atmosphère,
- Par consommation d'eau contaminée
- Et par contact avec la peau dans les zones agricoles, pharmaceutiques, manufacturières, résidentielles et industrielles.

Les métaux ne peuvent pas être décomposés et sont non biodégradables. Les organismes peuvent détoxifier les ions métalliques en cachant l'élément actif dans une protéine ou en les déposant dans des granules intracellulaires sous une forme insoluble qui sera dans les fèces de l'organisme ou pour un stockage à long terme.

Lorsque les métaux lourds sont avalés ou inhalés dans notre corps, ils s'accumulent dans notre système. Ils sont donc considérés comme dangereux. Cette bioaccumulation entraîne des complications biologiques et physiologiques.

Certains métaux lourds sont nécessaires à la vie et sont appelés éléments essentiels, car ils sont nécessaires à toute une série de fonctions biochimiques et physiologiques. Cependant, ils peuvent être toxiques lorsqu'ils sont présents en grandes quantités, comme le montre la Figure 3. Ils ont été largement utilisés dans l'agriculture, l'industrie, la médecine et d'autres secteurs, de sorte qu'ils ont été dispersés dans l'environnement, y compris dans l'atmosphère, les eaux et les sols.

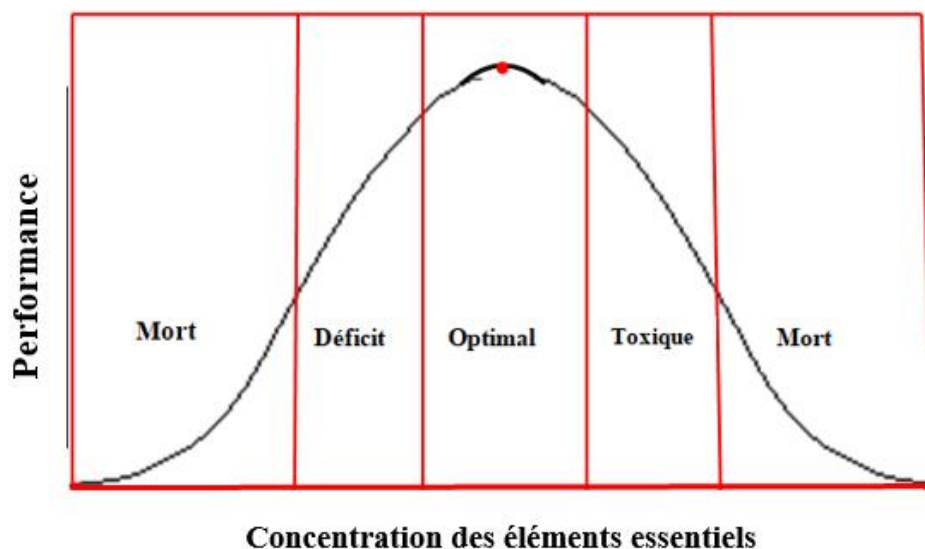


Figure 3: La relation entre les performances de la personne et la concentration de l'élément essentiel dans le régime alimentaire (**Briffa et al., 2020**).

- Les éléments essentiels sont regroupés en **trois groupes** :
 1. Les éléments majeurs nécessaires à l'organisme,
 2. Les macrominéraux.
 3. ET les oligo-éléments.

Quatre éléments majeurs sont nécessaires à la construction de la plupart des matières vivantes. Il s'agit de l'hydrogène, du carbone, de l'azote et de l'oxygène, en fonction de leur numéro atomique. Il existe **sept autres éléments majeurs** appelés **macro minéraux**, qui sont des éléments intégraux qui maintiennent l'équilibre ionique des composés structurels, des acides aminés et des acides nucléiques. Il s'agit **du sodium, du magnésium, du phosphore, du soufre, du chlore, du potassium et du calcium** en fonction de leur numéro atomique. Le dernier groupe est celui **des oligo-éléments**, qui comprend **treize éléments** : **le silicium, le vanadium, le chrome, le manganèse, le fer, le cobalt, le nickel, le cuivre, le zinc, l'arsenic, le sélénium, le molybdène et l'iode**, en fonction de leur numéro atomique.

- Les éléments essentiels sont importants pour :
 - Le maintien de la structure du squelette,
 - La régulation de l'équilibre acido-basique et
 - Le maintien du système colloïdal.

Ils sont également importants en tant que : Constituants d'enzymes clés, Des protéines structurelles et des hormones,

Exemples : comme le zinc, qui est un constituant de nombreuses enzymes, le fer est important pour l'hémoglobine, le sélénium est essentiel pour le peroxyde de glutathion. Le sélénium est essentiel pour l'enzyme glutathion peroxydase.

Les métaux non essentiels n'ont pas de rôle clé dans l'organisme, mais ils peuvent également être toxiques car ils peuvent affecter le niveau d'un élément essentiel dans l'organisme.

1.4.4 Toxicité des métaux lourds

La présence de métaux lourds toxiques dans l'air, le sol et l'eau est reconnue comme une source de menace croissante pour l'environnement et la santé humaine (**Xu et al., 2010**).

Contrairement aux polluants organiques, ils ne se dégradent pas mais s'accumulent tout au long de la chaîne trophiques à travers les activités industrielles et urbaines, y compris : Industries du charbon, du gaz et du papier (da Silva Oliveira *et al.*, 2007; Nithya *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2010).

Les ions de métaux lourds peuvent avoir des effets toxiques sur les plantes, les animaux ou les humains, et leur toxicité est liée à leur mobilité dans le sol. Plus la mobilité est élevée, plus le risque de toxicité de ces métaux augmente (Antoniadis & McKinley, 2003).

I.4.5 Effets des métaux lourds

I.4.5.1 Sur le sol et l'eau

Les métaux lourds tels que le plomb, l'arsenic, le cadmium et le mercure sont très répandus dans la nature, à des concentrations élevées ils provoquent des perturbations environnementales (sol et l'eau). La contamination des sols par les métaux lourds est l'un des principaux problèmes environnementaux dans le monde, leur présence peut affecter considérablement les propriétés physicochimiques du sol ainsi que la communauté microbienne et la réduction des activités environnementales et biologiques telles que la minéralisation de la matière organique (Gaur *et al.*, 2014; Sheng *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2009).

I.4.5.2 Les effets sur la santé humaine

Les métaux lourds tels que le mercure, le plomb, le cadmium et l'arsenic ont des effets néfastes sur la santé humaine. Ils peuvent s'accumuler dans les tissus et provoquer des troubles neurologiques, des maladies cardiovasculaires, des cancers, etc. (Järup, 2003).

Les femmes enceintes et les jeunes enfants sont particulièrement vulnérables aux métaux lourds, car ceux-ci peuvent nuire au développement du système nerveux central chez le fœtus et chez les jeunes enfants (Grandjean & Landrigan, 2006).

I.4.5.3 Les effets des métaux lourds sur les microorganismes

Les métaux lourds peuvent avoir des effets significatifs sur les microorganismes, y compris les bactéries, les champignons et les algues :

➤ Inhibition de la croissance et de la reproduction

Les métaux lourds tels que le cadmium, le mercure et le plomb peuvent inhiber la croissance et la reproduction des microorganismes (N Ahalya *et al.*, 2003).

Ils peuvent endommager les membranes cellulaires, perturber les processus métaboliques et entraîner la mort des cellules (Gupta *et al.*, 2006).

➤ **Altération de l'activité enzymatique**

Les métaux lourds peuvent inhiber l'activité enzymatique des microorganismes, en perturbant les réactions biochimiques essentielles (Fernández-Luqueño *et al.*, 2023).

Certains métaux lourds, comme le cuivre et le zinc, peuvent se lier à des groupes fonctionnels des enzymes, entraînant ainsi leur inactivation (Smit *et al.*, 1999).

➤ **Perturbation de la diversité microbienne**

Les métaux lourds peuvent modifier la composition de la communauté microbienne, en favorisant la croissance de certaines espèces tolérantes aux métaux et en supprimant d'autres espèces sensibles (Liu *et al.*, 2020).

Ils peuvent également réduire la biodiversité microbienne dans les écosystèmes aquatiques et terrestres.(Hu *et al.*, 2021).

I.4.6 Rôle des métaux lourds dans les processus biologiques

Les métaux lourds tels que le zinc, le cuivre, le fer et le manganèse jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques, y compris la catalyse enzymatique, la signalisation cellulaire et le transport des électrons. Ils sont nécessaires à la croissance et au développement des organismes vivants (Maret, 2011).

I.4.7 Résistance et accumulation de métaux

Certains microorganismes sont capables de développer des mécanismes de résistance aux métaux lourds, tels que l'activation de systèmes d'exportation des métaux ou la formation de complexes de détoxification (Nies, 1999).

Autres microorganismes peuvent accumuler les métaux lourds dans leur biomasse, permettant ainsi leur élimination de l'environnement (Zuo *et al.*, 2021).

I.5 La bioremédiation

I.5.1 La pollution

La pollution, selon diverses définitions, englobe un large éventail d'actions humaines ayant des effets néfastes sur l'environnement. Cela inclut la libération de composés toxiques dans la biosphère ainsi que la perturbation des écosystèmes en raison de la concentration excessive de substances apparemment inoffensives. Une définition générale la décrit comme une altération nuisible du milieu naturel, résultant en tout ou en partie de l'activité humaine, avec des répercussions directes ou indirectes sur l'énergie, les rayonnements, la composition chimique et la biodiversité de l'environnement. Une définition plus stricte précise qu'il s'agit de toute modification du flux énergétique, des rayonnements, de la concentration des composés chimiques naturels ou de l'introduction de substances chimiques artificielles dans la biosphère produites par l'homme. **(Ramade & Papigny, 2000).**

I.5.2 .Méthodes de traitement de la pollution

La réhabilitation des sites pollués repose sur l'utilisation de techniques de dépollution. Jusqu'à récemment, ces techniques étaient souvent basées sur des méthodes physico-chimiques et thermiques (abiotiques), nécessitant du matériel spécifique et du personnel spécialisé. Cependant, ces techniques ont également un impact négatif sur l'environnement, notamment lorsqu'il s'agit d'excaver le sol et de le transporter vers les zones de traitement, ce qui rend la décontamination très coûteuse. En revanche, les méthodes biologiques (biotiques), qui utilisent des micro-organismes sur les zones polluées, présentent un certain nombre d'avantages **(Bayou *et al.*, 2012).**

I.5.2.1 Traitements physiques/chimiques (abiotique)

Le traitement physico-chimique utilise les propriétés physiques et/ou chimiques des contaminants ou du milieu contaminé pour dépolluer (convertir chimiquement), séparer ou contenir les contaminants. Au cours du processus, les polluants sont modifiés par des réactions chimiques qui peuvent produire des composés toxiques séparables de la matrice solide **(Roy *et al.*, 1994).**

I.5.2.2 Traitements biologiques (biotique)

Le traitement biologique est un processus par lequel les contaminants présents dans le sol, les sédiments, les boues ou les eaux souterraines sont transformés ou dégradés en substances inoffensives par l'action métabolique d'organismes vivants, en particulier les microbes.

Les procédés biologiques sont généralement peu coûteux. En outre, les microbes sont souvent sensibles aux toxines ou aux contaminants fortement concentrés dans le sol (Roy *et al.*, 1994).

I.5.3 Définition Bioremédiation

La bioremédiation peut être définie comme le processus qui utilise et dépend des mécanismes biologiques pour transformer/dégrader/détoxifier les polluants en état inoffensif et finalement les minéraliser en dioxyde de carbone, en azote, en eau, etc. En utilisant la biomasse vivante ou morte (Kapahi & Sachdeva, 2019).

Les plantes, les champignons, les bactéries, les algues et les cyanobactéries font l'objet de nombreuses recherches et sont utilisés pour la bioremédiation des métaux lourds. Les micro-organismes sont les plus appropriés car ils sont plus faciles à manipuler, à cultiver et à mettre en œuvre. Ces dernières années, les micro-organismes, en particulier les bactéries, ont été reconnues pour leur capacité à adsorber, solubiliser et précipiter les métaux lourds par bioadsorption), bioaccumulation, biolixiviation et bioprécipitation. Leur omniprésence, leur abondance, leur diversité, leur petite taille et leur capacité unique à se développer et à se propager dans des conditions contrôlées et non contrôlées, ainsi que leur résilience environnementale, font des bactéries les meilleurs candidats pour la bioremédiation (Kapahi & Sachdeva, 2019).

I.5.4 Types de la bioremédiation

La bioremédiation peut être classée en :

I.5.4.1 Bioremédiation intrinsèque

Ce processus de biorestauration est également connu sous le nom d'atténuation normale. Il se produit dans les sols et les eaux contaminés par des toxines. Des micro-organismes sont impliqués et jouent un rôle important dans ce type de bioremédiation (Bayou *et al.*, 2012).

I.5.4.2 Biostimulation

Dans ce type de bioremédiation, l'environnement est modifié en motivant les bactéries utilisées pour la bioremédiation. Les experts libèrent de l'oxygène et d'autres nutriments dans le sol où résident les micro-organismes. L'activité des bactéries et autres micro-organismes s'en trouve stimulée et ils éliminent plus efficacement les contaminants de l'environnement ou de l'eau (Bayou *et al.*, 2012).

I.5.4.3 Bioaugmentation

La bioaugmentation est une technique qui utilise des micro-organismes (généralement des bactéries, des protozoaires et des champignons) pour traiter les zones (sol et eau) affectées par divers polluants à base de carbone, d'azote ou de phosphore. Les micro-organismes déjà présents dans le sol ou l'eau ne sont pas capables d'éliminer la pollution, c'est pourquoi l'utilisation de micro-organismes externes est nécessaire (Bayou *et al.*, 2012).

I.5.5 Mécanisme de bioremédiation

Plusieurs souches bactériennes ont développé des mécanismes divers et discrets pour s'adapter, interagir, s'acclimater et prospérer dans un environnement riche en minéraux et en particulier en métaux lourds. Ces mécanismes comprennent l'absorption des métaux lourds à la surface de la cellule par biosorption, la séquestration intracellulaire par accumulation, la séquestration extracellulaire sous forme de composés insolubles par précipitation, et la production de métabolites qui solubilisent et chélatent les composés métalliques, ce qui conduit à la lixiviation.

Les différents mécanismes et leurs différents modes, présentés par les bactéries pour éliminer et annihiler les métaux lourds, sont décrits dans la Figure 4 et discutés dans la section suivante (Sreedevi *et al.*, 2022).

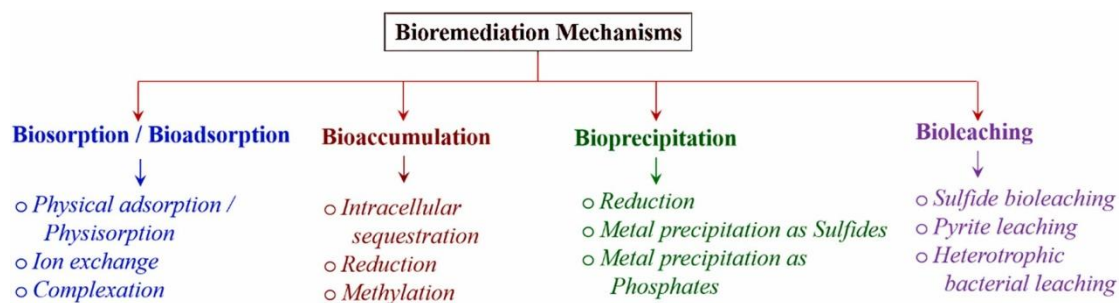


Figure 4: Différents mécanismes impliqués dans l'élimination des métaux lourds par les bactéries en milieu liquide.

I.5.5.1 Bioadsorption/biosorption

La biosorption/bioadsorption est un processus physico-chimique non dirigé qui implique l'interaction entre des métaux/minéraux organiques et inorganiques et des substances cellulaires (Gupta *et al.*, 2000; Sahmoune & Louhab, 2010). Les principaux mécanismes de biosorption comprennent l'adsorption de surface, la physisorption, la chimisorption, l'échange d'ions et l'adsorption physique. L'adsorption de surface se produit lorsque des ions

métalliques chargés positivement dans le milieu sont attirés par des ligands chargés négativement présents sur la paroi cellulaire (Gadd, 2001). L'adsorption physique est principalement due à des forces de Van der Waals, tandis que l'adsorption chimique ou activée implique une attraction entre l'adsorbant et l'adsorbat. L'adsorption globale du métal résulte de l'ensemble de ces mécanismes (Brown et al., 2000). Dans le cas de la fixation des métaux lourds, cela se produit en deux étapes : l'interaction entre les groupes réactifs à la surface des cellules bactériennes et les ions métalliques, suivie d'un dépôt de métal (Gadd, 2001).

Des études spectroscopiques et de modification chimique ont montré que, les radicaux cellulaires comme l'hydroxyle, le carboxyle, le sulfate, le sulfhydryle (thiol), thioéther, phosphate, phosphonate, phosphodiester, amino, imine, amide, imidazole et carbonyle (cétone) possèdent un fort potentiel de métal (Singh et al., 2020). Le tableau 1 élucide l'occurrence et la position de ces radicaux actifs dans la structure cellulaire bactérienne. La plupart de ces groupes sont présents sur la paroi cellulaire bactérienne. L'ionisation de ces groupes fonctionnels rend la surface de la cellule bactérienne chargée négativement, viable pour la fixation de métaux cationiques (Brown et al., 2000).

Tableau 1: Radicaux liant les métaux présents dans la structure des cellules bactériennes.

Radicaux cellulaires liant les métaux	Présence dans les composés cellulaires	Position dans la structure cellulaire
Carboxyle	Acides gras, protéines, acides organiques	Membrane cellulaire, paroi cellulaire, cytosol
Hydroxyle Sulfate	Alcools, hydrates de carbone Acides aminés - cystéine, méthionine	Membrane cellulaire, paroi cellulaire, cytosol Membrane cellulaire, cytosol
Sulfhydryle (Thiol)	Acide aminé-cystéine	Membrane cellulaire, protéines du cytosol
Phosphate	ADN, ARN, ATP	Membrane cellulaire, cytosol, chromosomes
Amines	Protéines et acides nucléiques	Membrane cellulaire, paroi cellulaire, cytosol
Amide	Liaisons acides gras-	Lipides de la membrane

	aminoacides	cellulaire
Imine	Acides aminés désaminés	Membrane cellulaire, paroi cellulaire, cytosol
Ester	Lipides	Membrane cellulaire, cytosol
Thioéther	Aminoacides	Membrane cellulaire, paroi cellulaire, cytosol
Carbonyl (cétone)	Polysaccharides, cétones Polysaccharides, aldéhydes	Membrane cellulaire, paroi cellulaire, cytosol
Imidazole	Aminoacides et acides nucléiques	Tous les composants protéiques de la membrane cellulaire, du cytosol, des ribosomes et des acides nucléiques.
Phosphonate	Fractions lipidiques, phosphonolipides	Exopolysaccharides
Phosphodiester	ADN, ARN	ADN, ARN, ribosomes

Les bactéries possèdent des parois cellulaires principales composées de peptidoglycanes, qui sont des chaînes de sucre interconnectées avec des chaînes peptidiques. Les bactéries Gram-positives ont également un glycopolymère d'acide téichoïque incorporé dans leur paroi, ce qui augmente leur charge négative. Les parois cellulaires des bactéries Gram-négatives, quant à elles, sont moins réticulées et moins épaisses que celles des bactéries Gram-positives. Les bactéries Gram-négatives ont une membrane externe formée de lipopolysaccharides (LPS), de lipoprotéines et de phospholipides. Les bactéries Gram-positives présentent des glycoprotéines sur leur surface externe qui offrent des sites de liaison plus accessibles que les LPS et les phospholipides (Gadd, 2001).

I.5.5.1.1 Adsorption physique/physisorption

L'adsorption physique, également appelée physisorption, est le phénomène de transfert d'ions d'une phase liquide à une phase solide. Ce processus implique le transfert en vrac vers la couche périphérique, la diffusion à travers les pores et l'adhésion à la surface extérieure. L'adsorption se produit en raison de forces d'attraction non spécifiques comme les forces de

Van der Waals et les forces électrostatiques coulombiennes(Sahmoune& Louhab, 2010). Les interactions physico-chimiques entre les radicaux cellulaires de la paroi et de la membrane des bactéries et les espèces métalliques dans la solution sont les principaux facteurs responsables de l'adsorption rapide et réversible dans les biomasses de cellules mortes(Hasan *et al.*, 2009). Des études ont montré que les groupes amine, hydroxyle et carboxyle présents à la surface des cellules bactériennes étaient les principaux responsables de l'adsorption. Par exemple, les groupes anioniques présents sur les parois des cellules bactériennes de *Streptomycesrimosus* ont montré une adsorption élevée des ions Pb^{+2} (Selatnia *et al.*, 2004).

I.5.5.1.2 Echanged'ions

Le mécanisme d'échange d'ions dans les cellules implique la fixation de cations métalliques sur des sites vides, en remplacement d'autres cations. Les ions bivalents des métaux sont adsorbés grâce à un échange avec les contre-ions polysaccharides présents sur la paroi cellulaire et la membrane externe des bactéries(Li *et al.*, 2009). Ce processus dépend de divers facteurs tels que le type et le nombre de sites présents sur la surface cellulaire, ainsi que leur schéma d'ionisation, qui est influencé par le pH et la valeur pKa des groupes respectifs. Les groupes amines protonés ont une charge positive et deviennent neutres lorsqu'ils sont déprotonés, tandis que les groupes phosphate, carboxyle et sulfate deviennent neutres lorsqu'ils sont protonés et se chargent négativement lorsqu'ils sont déprotonés(Naja *et al.*, 2010). Différents microorganismes ont été étudiés pour leur capacité à adsorber des métaux tels que le nickel, le plomb et le cuivre par échange d'ions, et il a été observé que ces processus étaient influencés par le pH(Hasan *et al.*, 2009).

I.5.5.1.3 Complexation

La remédiation des métaux peut se faire par la formation de complexes à la périphérie des cellules, grâce à l'interaction de radicaux réactifs et d'ions métalliques en solution. Différents groupes fonctionnels présents sur les parois cellulaires, tels que les groupes amino, carboxyle, hydroxy, thiol et phosphate, peuvent interagir avec les ions métalliques pour former des complexes de coordination(Sag& Kutsal, 2001). Lorsqu'un ligand est lié à l'atome central par plusieurs atomes coordinateurs, le complexe est appelé "chélate"(Naja *et al.*, 2010). Des complexes de plusieurs métaux tels que le magnésium, le calcium, le cadmium, le cuivre, le zinc et le mercure ont été observés dans le *Pseudomonas*. La complexation est un processus essentiel de biosorption, notamment à des pH alcalins(Leung *et al.*, 2000). Des études ont

montré que les groupes hydroxyles, phosphoryles, carboxyles et aminés présents dans les protéines et les polysaccharides de la matrice extracellulaire de certaines bactéries peuvent former des complexes avec des métaux lourds tels que le chrome(An *et al.*, 2022).

I.5.5.2 La bioaccumulation

La bioaccumulation est le processus par lequel les métaux non métaboliques s'accumulent dans les cellules bactériennes en utilisant la même voie de transport que les métaux essentiels au métabolisme. Ce processus se fait en liant les ions métalliques aux radicaux réactifs à la surface extérieure de la paroi cellulaire bactérienne, ainsi qu'à sa région interne, de manière indépendante de l'énergie. Ensuite, les métaux se diffusent dans le cytoplasme de la cellule par un processus dépendant ou indépendant de l'énergie. Il est probable que la même voie de transport utilisée pour les ions métaboliquement essentiels soit également utilisée pour le transport des métaux lourds à travers les membranes des cellules microbiennes afin de les accumuler à l'intérieur de la cellule. Les systèmes de transport des cations se lient aux ions de métaux lourds dont le rayon ionique et la charge sont identiques à ceux des ions de métaux essentiels(Sag& Kutsal, 2001).

I.5.5.2.1 Le transport intracellulaire

Le transport intracellulaire des métaux lourds chez les bactéries se fait à travers différents mécanismes. Les canaux sont des protéines qui permettent la diffusion passive des métaux selon les gradients de concentration. Les protéines β -barrel et les porines, présentes dans les bactéries gram-négatives, peuvent aussi transloquer les métaux lourds. Les protéines porteuses secondaires, comme les uniporteurs, symporteurs et antiporteurs, participent à l'accumulation des métaux lourds. Les principales protéines porteuses de cette fonction sont les protéines de la super-famille des récepteurs couplés à la protéine G de l'opsine et les protéines de la super-famille des facilitateurs majeurs, qui utilisent la force motrice des protons pour déplacer les métaux dans la cellule bactérienne. Enfin, les protéines transporteuses actives primaires sont des protéines intégrées dans la membrane plasmique des bactéries, comprenant une partie transmembranaire et un composant de couplage de l'ATPase cytosolique, qui participent également au transport des métaux lourds.

Les bactéries utilisent l'interaction entre les métaux et les ligands de leur surface pour transporter lentement les métaux à l'intérieur de leurs cellules. Elles libèrent des molécules de coordination appelées sidérophores, qui se lient aux atomes de fer. La synthèse de

sidérophores est une réponse à la pénurie de fer dans l'environnement. Ces sidérophores peuvent également se lier à d'autres métaux tels que le thorium, l'uranium, le nickel, le gallium et le cuivre. Les sidérophores bactériens sont classés en catécholates, carboxylates et hydroxamates, et les bactéries utilisent différents systèmes de transport du fer en fonction de leur classification gram-positif ou gram-négatif. Les bactéries à Gram négatif, comme *Escherichia coli*, possèdent une membrane externe qui facilite le transport du fer (Sreedevi *et al.*, 2022).

I.5.5.2.2 Devenir intracellulaire des métaux lourds bioaccumulés

Les cellules bactériennes en croissance sont capables d'éliminer perpétuellement les métaux par des méthodes de détoxification interne. La biotransformation et la réduction des métaux à l'aide d'enzymes, la méthylation, la séquestration par la complexation métallo-organique, et la production de chélateurs de métaux - les métallothionéines - sont les différents mécanismes mis en œuvre par les bactéries pour se défendre contre la toxicité des métaux (Ramasamy *et al.*, 2007).

I.5.5.2.2.1 La séquestration intracellulaire

La séquestration intracellulaire est un processus par lequel les ions de métaux lourds se lient ou sont emprisonnés dans les organites cellulaires lorsqu'ils pénètrent dans les cellules. Ce processus est facilité par des composés tels que les métallothionines, la glutamylcystéine et la cystéine, qui se lient aux métaux cytoplasmiques. Les protéines de stockage du fer, du cuivre et du zinc, telles que la ferritine et les métallothionines, sont également présentes dans les cellules bactériennes pour séquestrer ces métaux (Klein & Lewinson, 2011). Les souches bactériennes spécifiques ont été manipulées pour leur potentiel d'accumulation de métaux afin de traiter les effluents. Par exemple, *Rhizobium leguminosarum* a montré une importante séquestration intracellulaire des ions de cadmium avec l'aide du glutathion (Lima *et al.*, 2006). Des espèces de *Bacillus* isolées de la mer Méditerranée ont également été trouvées capables d'accumuler du plomb, du cadmium et de l'aluminium dans des grains de polyphosphate grâce à leur séquestration intracellulaire (Gadd, 2001).

I.5.5.2.2.2 Réduction des ions de métaux lourds

Les bactéries utilisent les métaux et les métalloïdes pour produire de l'énergie en utilisant ces éléments comme donneurs ou accepteurs d'électrons. Les bactéries anaérobies peuvent réduire les ions métalliques oxydés, réduisant ainsi leur toxicité. Certains métaux oxydés, tels

que le fer, le manganèse et le chrome, sont utilisés comme accepteurs d'électrons terminaux par les bactéries anaérobies(Thamdrup, 2000). Certaines bactéries sont capables de réduire le sélénium et l'arsenic lors de la respiration anaérobie, fournissant ainsi de l'énergie pour le métabolisme et la croissance(Nancharaiah& Lens, 2015). Les bactéries sont également capables de détoxifier le mercure et le chrome grâce à des enzymes spécifiques. La réduction enzymatique du chromate dépendante du cuivre a été observée chez une espèce bactérienne. De plus, certaines bactéries peuvent réduire l'ion argentique en nanoparticules d'argent colloïdal. Enfin, la réduction de l'arséniate est réalisée par des procaryotes grâce à une enzyme spécifique(Sreedevi *et al.*, 2022).

I.5.5.2.2.3 Méthylation des métaux

Les souches bactériennes peuvent méthyler différents métaux, métalloïdes et composés organométalliques en dérivés méthyliques, qui sont souvent volatils et s'évaporent(Gadd, 2001). La méthylation est une voie biochimique importante dans les cellules bactériennes, se produisant par l'intermédiaire de trois voies différentes impliquant la S-adénosylméthionine, la méthyl-cobalamine et la N-méthyltétine. Les bactéries utilisant le sulfate ou le fer réduisent le mercure grâce à la méthylcobalamine, tandis que l'arsenic est méthylé par la S-adénosylméthionine(Mason, 2012). Différentes bactéries comme *Escherichia sp*, *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp* et *Clostridium sp* peuvent également biométhyler d'autres métaux tels que le sélénium et le plomb en composés volatils ou décomposables(Ramasamy *et al.*, 2007). Chaque voie de méthylation est spécifique et varie en fonction des espèces bactériennes et de l'état d'oxydation des métaux dans le sol(Mason, 2012).

La figure 5 illustre le transport intracellulaire des métaux lourds et leur accumulation dans les cellules bactériennes.

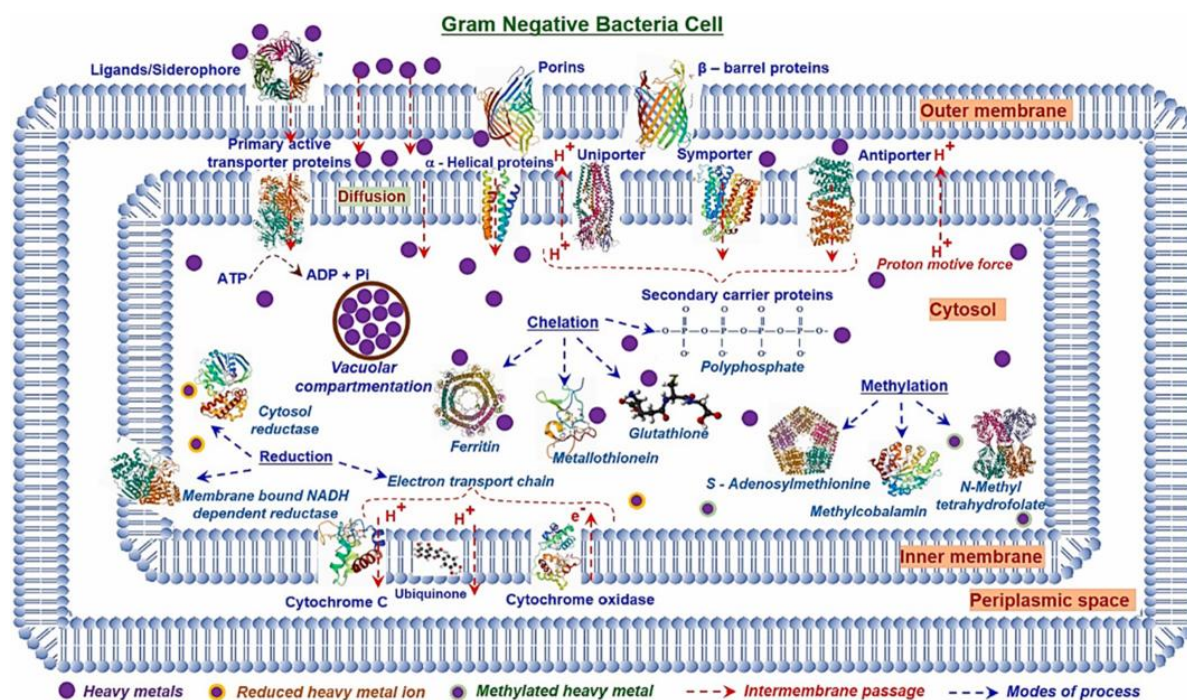


Figure 5: Illustration du passage intracellulaire des métaux lourds par différents canaux et de leur bioaccumulation dans la cellule bactérienne par différents mécanismes (i) Stockage vacuolaire, (ii) Séquestration par la ferritine, la métallothionéine, le glutathion et les molécules de polyphosphate, (iii) Réduction en recevant des électrons de la chaîne de transport d'électrons ou par l'action enzymatique, et (iv) Méthylation (Structures des protéines selon le format PDB).

I.5.5.3 Bioprécipitation

L'élimination des métaux en solution par précipitation est souvent associée au mécanisme de défense des bactéries. La précipitation indépendante du métabolisme cellulaire est due à l'interaction chimique entre la surface des cellules bactériennes et les ions métalliques (Naidu Ahalya *et al.*, 2003). La précipitation se produit par réduction, sulfure et sous forme de phosphates en fonction de l'espèce bactérienne et de l'environnement.

I.5.5.3.1 Réduction

Le processus de réduction se produit chez les bactéries. Certaines souches bactériennes peuvent réduire les formes ioniques dangereuses du sélénite et du sélénate en sélénium élémentaire, qui forme un précipité rouge sur les colonies bactériennes. Par exemple, *Desulfomicrobium norvegicum* a été observé de précipiter du sélénium élémentaire avec du soufre (Hockin & Gadd, 2003), et une souche d'*Alteromonas putrefaciens* a réduit le U(VI), produisant un précipité noir de carbonate d'U(IV) (Fredrickson *et al.*, 2000). De plus,

Shewanellaoneidensis MR-1 et deux espèces de Geobacter ont réduit le Hg(II) en Hg(0) en présence d'accepteurs d'électrons(Wiatrowski *et al.*, 2006). Les bactéries impliquées dans la réduction de l'uranium et les mécanismes impliqués ont été étudiés par You et al.(You *et al.*, 2021).

I.5.5.3.2 Précipitation des métaux sous forme de sulfures

Les bactéries sulfato-réductrices sont des organismes anaérobies qui utilisent le sulfate comme accepteur d'électrons pour leur métabolisme énergétique. Elles oxydent les composés organiques ou l'hydrogène, ce qui entraîne la réduction du sulfate en sulfure. Ce sulfure réagit ensuite avec les métaux disponibles dans l'environnement, formant des sulfures métalliques qui sont insolubles, à l'exception des métaux alcalins et alcalino-terreux. La précipitation de ces sulfures protège les bactéries sulfato-réductrices de la toxicité des métaux, tandis que les métaux protègent les bactéries de la toxicité des sulfures(Gadd, 2001). De plus, ces bactéries peuvent réduire biochimiquement certains métaux tels que l'uranium et le chrome (Spear *et al.*, 2000). La formation enzymatique de sulfure à partir de thiosulfate a été observée chez certaines bactéries(Bang *et al.*, 2000), et des études ont montré que des souches de *Klebsiellaplanticola* résistantes au cadmium étaient capables de précipiter de petites quantités de sulfure de cadmium en présence de thiosulfate(Sharma *et al.*, 2000).

I.5.5.3.3 Précipitation des métaux sous forme de phosphates

La méthode de précipitation décrite dans le texte utilise l'enzyme phosphatase pour libérer du phosphate inorganique (Pi) du phosphate organique présent dans les cellules. Ce Pi précipite ensuite les métaux/radionucléides sous forme de phosphates à la surface des cellules. Les cellules immobilisées d'une certaine bactérie ont été capables de précipiter des métaux tels que le cuivre, le cadmium, le plomb et l'uranium à partir de solutions enrichies en glycérol-2-phosphate(Sreedevi *et al.*, 2022).

La précipitation peut être soit dépendante soit indépendante du métabolisme de la bactérie. Dans le premier cas, la réaction entre les composés moléculaires produits par la bactérie et les métaux cibles dans le milieu entraîne la cristallisation des métaux. Dans le second cas, la précipitation indépendante du métabolisme est due à une interaction chimique entre les métaux dissous et les radicaux réactifs à la surface des cellules bactériennes. Les cellules bactériennes vivantes et mortes peuvent précipiter des métaux lourds, mais la biomasse morte est moins efficace(Sreedevi *et al.*, 2022).

Matériels

Et Méthodes

II Matériel et méthodes

Objectif

Notre travail de recherche est réalisé au sein du laboratoire de microbiologie situé au niveau de l'université M'HAMED BOUGARA de Boumerdes (UMBB) et du centre d'étude et de service technologique de l'industrie des matériaux de construction de Boumerdes. Il a pour objectif l'étude de l'effet de deux métaux (plomb et argent) sur la croissance cellulaire et la production des pigments caroténoïdes et de biosurfactants des souches halophiles F1 et F2.

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel non biologique

Les équipements, les verreries, matériels en plastique, les réactifs et les modes opératoires utilisés pour la réalisation de notre travail sont cités dans l'annexe 1.

II.1.2 Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées durant cette étude sont des souches halophiles extrêmes connues sous l'appellation F1, F2. Isolées à partir de Sebkhass algériennes par l'unité de recherche « Biodiversité microbienne et biotechnologies des Ecosystèmes Aquatiques salins et pétroliers (BMBEAP) au sein de laboratoire conversion et valorisation des ressources biologiques de la faculté des sciences. Elles ont été identifiées comme étant des souches halophiles. La conservation de ces souches a été faite à 4°C dans un milieu liquide spécifique SH standard, additionné de 15% de Na Cl.

II.1.2.1 Le milieu de culture

Un seul milieu de culture a été utilisé dans ce travail :

- ✓ **Le milieu spécifique SH standard (Zinder & Dworkin, 2006):** qui est un milieu homogène composé principalement de chlorure de sodium Na Cl ajusté à PH=7, utilisé pour la revivification des souches halophiles extrêmes. Ce milieu présente une forte salinité et l'amidon à raison de 2g/l comme source de carbone. La composition de milieu SH standard est donnée dans l'annexe 2.

II.2 Méthodes**II.2.1 Préparation de milieu SH**

Tous les composants de milieu indiqués dans l'annexe 2 sauf le chlorure de sodium sont mélangés dans un erlenmeyer de 1000 ml rempli d'eau distillée sous une agitation magnétique. Après homogénéisation de ces constituants le PH est ajusté entre 7 et 7,5 par l'ajout de NaOH et HCL avant la stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 min. Le chlorure de sodium est stérilisé à part dans un Erlenmeyer de 100 ml pour éviter la précipitation des autres constituants du milieu pendant l'autoclavage, puis rajouté aseptiquement aux autres éléments avant l'utilisation (Figure 6).



Figure 6: Aspect de milieu SH liquide.

II.2.2 Revivification des souches halophiles F1 et F2

Nous avons initié le processus par revivification des souches halophiles F1 et F2 qui avaient été préalablement conservées à 4°C. Cette première étape a été réalisée près du Bec Benzène par l'ensemencement des souches dans des erlenmeyers de 50 ml qui avaient été préalablement stérilisés par autoclavage. Chaque erlenmeyer contenait 30 ml du milieu liquide stérile SH ajusté à un pH de 7. Ensuite, les erlenmeyers ont été placés dans un agitateur-incubateur fonctionnant à 140 rpm et à une température de 40°C, où ils ont été incubés pendant une période allant de 5 à 7 jours. Après 7 jours d'incubation, nous avons effectué un ensemencement des souches F1 et F2 revivifiées sur des boîtes de Pétri étiquetées contenant du milieu SH solide, et aussi incubées pendant 5 à 7 jours dans l'étuve à 40°C (Kebbouche-Gana *et al.*, 2009).

II.2.3 Vérification de la pureté des souches halophiles

Après l'incubation, nous avons procédé à une analyse macroscopique et microscopique, en utilisant la coloration de Gram, ainsi qu'une observation à l'état frais, afin de vérifier la pureté des souches bactériennes.

II.2.3.1 Etude macroscopique

Après l'isolement et l'incubation, la première étape consiste en l'examen macroscopique des cultures. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température d'incubation, pour cela des cultures ont été réalisées sur des milieux SH solide dans des boîtes de pétri (Annexe 1) afin de voir les différentes colonies, le repiquage a été fait à partir des cultures liquides avec une incubation dans l'étuve à 40°C.

Les éléments de l'identification macroscopique sont :

1. Taille : diamètre des colonies, pouvant être punctiformes ou non punctiformes.
2. Forme des colonies : circulaire, ondulée, ou filamenteuse.
3. Opacité : caractérisée comme opaque, translucide ou transparente.
4. Aspect de surface : lisse, rugueux, brillant ou dentelé.
5. Consistance : évaluée au moment du prélèvement, pouvant être visqueuse, sèche ou muqueuse.
6. Couleur ou pigmentation : la couleur des colonies correspond à celle de la gélose (pigments diffusibles).
7. Odeur : présence ou absence d'odeur.
8. Élévation : surface convexe, concave ou plate.

II.2.3.2 Examen microscopique

C'est une étape très importante pour l'identification des microorganismes (**Marchal *et al.*, 1982**). Elle consiste à observer les cellules bactériennes à l'état frais et après une coloration de Gram.

Observation microscopique à l'état frais :

Cette observation permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des souches étudiées. Il s'agit d'une observation des bactéries vivantes en absence de toute fixation. Elle consiste à observer une goutte de la suspension bactérienne déposée à l'aide d'une pipette

Pasteur stérile entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope photonique à grossissement X 40 (Singleton, 1999).

Coloration de Gram modifiée :

C'est une double coloration qui permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté, ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules des archaebactéries purifiées (Dussault, 1955). Cette coloration permet de classer les archaebactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors de lavage à l'éthanol (elles sont à Gram-), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (elles sont à Gram+) (Marchal *et al.*, 1982). Elle se passe par les deux étapes suivantes:

- **Préparation du frottis :**

Une goutte de la suspension bactérienne étudiée est déposée sur une lame, puis étalée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile de façon à obtenir un frottis mince et homogène, ensuite des passages rapides sur la flamme du Bec Bunsen sont effectués afin de sécher et fixer le frottis.

- **Coloration du frottis :**

Les cellules sont traitées avec de l'acide acétique à 2% pendant 5 minutes, suivie d'une première coloration au cristal violet de Gentiane pendant une minute, puis rincées à l'eau distillée et ensuite recolorées par la fuchsine pendant 1 minute et 30 secondes puis rincées avec l'eau distillée. La lame est ensuite séchée au Bec Bunsen, l'observation est effectuée au microscope photonique à immersion au grossissement x 100.

II.2.4 Etude de l'effet des métaux lourds sur la croissance des souches F1 et F2

Dans ce travail nous avons testé l'effet de deux métaux lourds le plomb et l'argent sous forme de sels solubles $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ et AgNO_3 à différentes concentrations sur la croissance et sur la pigmentation des souches F1 et F2. Les étapes de l'expérience sont décrites ci-dessous :

II.2.4.1 Préparation des solutions mères

Les solutions mères de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ et AgNO_3 ont été préalablement préparées dans des Erlenmeyers, contenant une quantité du métal mesurée de 0,1 g, et complétées avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 100 ml puis agitées pendant quelques minutes pour avoir une solution homogène. Les mesures sont mentionnées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2: Mesures effectuées pour la préparation des solutions mères.

Les métaux utilisés	Quantité du métal (g)	Quantité de l'eau distillée (ml)
$(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1g/l)	0.1	100
AgNO_3 (1g/l)	0.1	100

II.2.4.2 Préparation des pré-cultures

Les pré-cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml, contenant un volume de la souche halophile F1 revivifiée ainsi que la souche F2, additionnées d'un volume du métal testé, puis complétées avec du milieu SH liquide jusqu'à 100 ml. Les pré-cultures ont été par la suite incubées dans un incubateur-agitateur à 40°C avec une agitation de 150 rpm pendant 05 jours pour avoir une bonne croissance cellulaire et apparition d'une pigmentation rouge-orange caractéristique de la croissance de la souche halophile F1 et rouge pour F2. Le tableau 3 résume les différentes mesures effectuées pour la préparation des différentes pré-cultures.

Tableau 3: Concentrations des métaux lourds testés dans les pré-cultures des deux souches halophile F1 et F2.

Pré-cultures	1ppm (AgNO_3)	1ppm $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
Volume de la souche halophile F1/ F2 (ml)	10	10
Volume de la solution mère du métal (ml)	0,1	0,1
Volume du milieu de culture SH liquide (ml)	89,9	89,9
Volume final de la pré-culture	100 ml	100 ml

II.2.4.3 Préparation des cultures en présence des deux métaux lourds

Après 5 jours d'incubation, des cultures (des deux souches F1 et F2) à différentes concentrations de chaque métal : 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ppm pour le plomb et l'argent ont été préparées pour un volume finale de culture de 100 ml inoculées à raison de 10 ml de la pré-culture correspondante pour chaque métal. Les mesures effectuées pour la préparation des pré-cultures sont mentionnées dans le tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4: Mesures effectuées pour la préparation des pré-cultures des souches halophiles F1 et F2 en présence des métaux lourds testés.

Métaux	(AgNO ₃)						Pb(CH ₃ COO) ₂					
Concentrations du métal (ppm)	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Volume de la Solution Mère du métal (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Volume du milieu SH (ml)	89,9	89,8	89,7	89,6	89,5	89,4	89,9	89,8	89,7	89,6	89,5	89,4
Volume de la pré-culture (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

- Le volume prélevé de la solution mère est calculé par la formule suivante :

$$C_1V_1=C_2V_2$$

C1 : Concentration de la solution mère.

V1 : Volume prélevé de la solution mère.

C2 : Concentration de la gamme testée.

V2 : Volume final de culture.

Par ailleurs, deux flacons contenant 90 ml du milieu SH liquide un inoculé par 10 ml de la souche halophile F1 et un inoculé par 10 ml de la souche halophile F2 ont été utilisé comme témoin (sans métal). Les cultures et le témoin ont été ensuite incubés dans un agitateur rotatif à 150rpm à 40°C.

II.2.5 Suivi de la croissance cellulaire de la souche halophile F1 et F2 en présence des métaux étudiés

Le suivi de la croissance bactérienne en présence des métaux lourds est réalisé en mesurant la densité optique (DO) au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 600 nm. Cette mesure est considérée comme un indicateur biologique direct de la croissance et de la résistance aux métaux lourds testés.

Principe

Pour la mesure de la densité optique, on se base sur la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A : densité optique.

I₀ : intensité de la lumière incidente.

I : intensité de la lumière émergente.

ε : absorption molaire (absorption d'une solution $c=1$ mol/l dans une cuvette de dimension de $l=1$ cm) [1/mole.cm].

C : concentration molaire [mol/l].

l : épaisseur de la cuvette [cm].

II.2.6 Mise en évidence de la production des biosurfactants

La mise en évidence de la production des biosurfactants par la souche F1 et F2 en présence des métaux testés à différentes concentrations a été réalisée par le mesure de l'index d'émulsion 24. Ce dernier permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (Gasoil) dans une phase hydrophile (le milieu de culture). Le test consiste à mélanger 3ml de la culture de différentes concentrations du métal avec 3ml de gasoil dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 3min, puis après homogénéisation des deux phases, les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante puis on procède au calcul de l'index d'émulsification (Bodour *et al.*, 2004).

❖ Calcul de l'index d'émulsification (E24)

L'index d'émulsion selon (Balali-Mood *et al.*, 2005) est calculé après 24 heures selon la formule suivante :

$$E24 = (He/Ht) \times 100$$

He : Hauteur de l'émulsion.

Ht : Hauteur total.

II.2.7 Etude de l'effet des métaux lourds testés sur la pigmentation des souches halophiles F1 et F2

Cette expérience a été réalisée pour vérifier l'effet des deux métaux lourds testés ((CH₃COO)₂ Pb·3H₂O, AgNO₃) à différentes concentrations sur la production du pigment caroténoïde par les halophiles F1 et F2. L'extraction des pigments produits a été réalisée selon les étapes mentionnées dans la figure 7 :

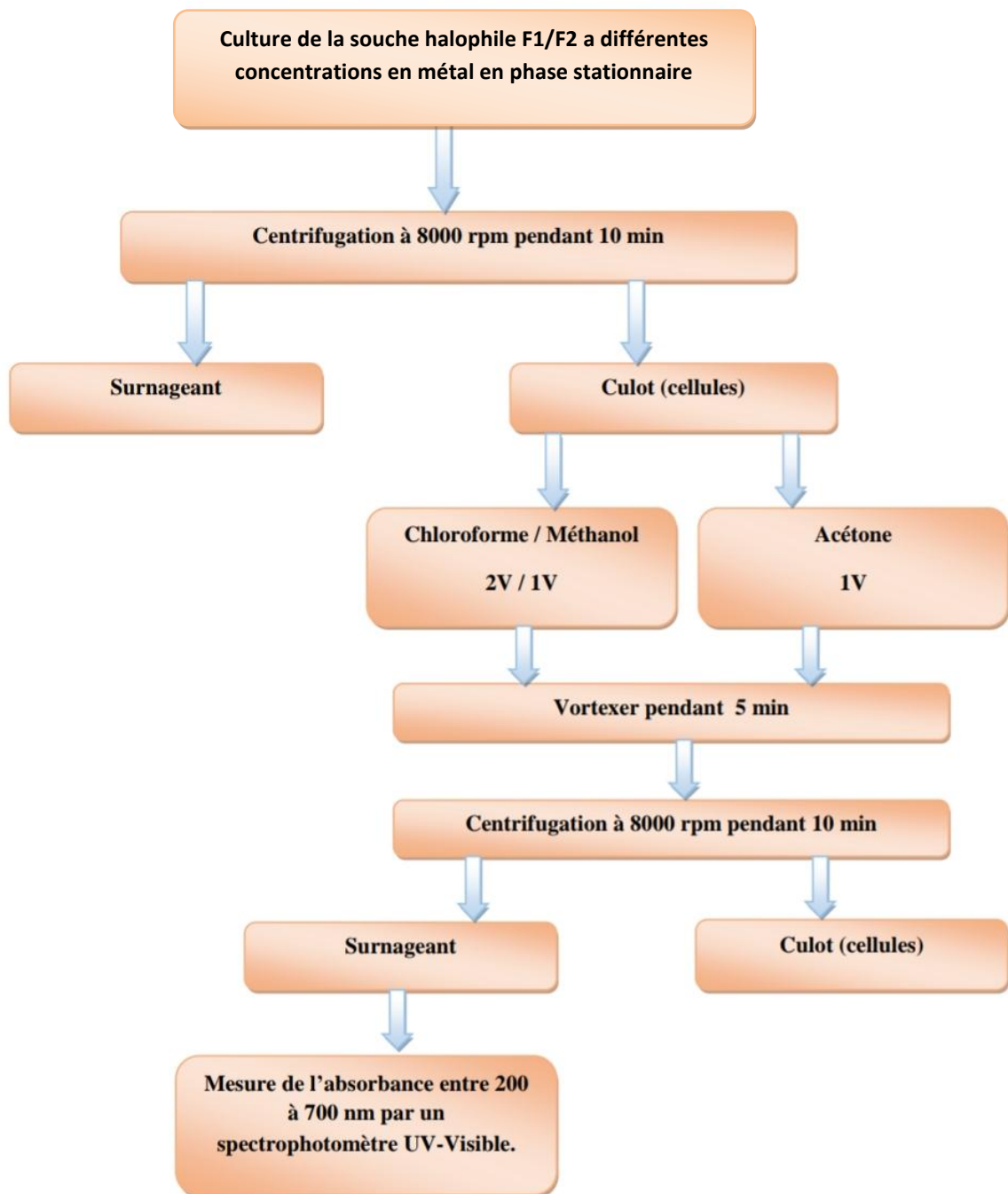


Figure 7 : Protocole d'extraction des pigments membranaires (Kulkarni et al., 2016).

II.2.8 Dosage du plomb et d'argent restants dans les surnagent des différentes cultures par la technique SAA

Les quantités de plomb et d'argent résiduelle dans les témoins et les surnageant des cultures des souches halophiles F1 et F2 sélectionnées avec la concentration de 6 ppm, ont été dosés à l'aide d'une analyse spectroscopique d'absorption atomique (SAA) au laboratoire de CETIM.

Deux tubes de témoins et 4 tubes contenant le surnagent des deux souches (F1 et F2) ont été choisi avec des concentrations de 6ppm de Pb et Ag, Le premier témoin contient le milieu SH avec 6 ppm de plomb et le deuxième témoin qui contient le milieu SH avec 6 ppm d'argent.

Les cultures après 15 jours d'incubation en présence de Plomb et d'Argent ont été centrifuges à 8000 rpm pendant 20 minutes pour séparer les cellules du milieu. Les surnageants obtenus à différentes concentrations des deux métaux de 1ppm jusqu'à 6pp ont été disposés dans des tubes coniques, deux tubes de témoins et 4 tubes contenant le surnagent des deux souches (F1 et F2) ont été choisi avec des concentrations de 6ppm de Pb et Ag, Le premier témoin contient le milieu SH avec 6 ppm de plomb et le deuxième témoin qui contient le milieu SH avec 6 ppm d'argent pour être dosés par la technique SAA au CETIM.

Les valeurs obtenues par l'analyse représentent les concentrations résiduelles du Plomb et de l'Argent dans le milieu, la concentration accumulée par les bactéries est calculée en ôtant la concentration résiduelle déterminée, de la concentration initiale utilisée, d'un autre coté nous avons préparé deux témoins sans bactéries avec de concentration de 6ppm de Plomb et de l'Argent.

L'analyse par absorption atomique (SAA) fut initialement élaborée par le physicien australien **Alan Walsh en 1955,(Genin, 2007)**. Cette méthode se révèle être extrêmement sensible dans la quantification de plus de 70 métaux différents, elle permet le dosage mono-élémentaire des cations majeurs dans des échantillons liquides. Les applications sont nombreuses étant donné qu'on atteint couramment des concentrations inférieures au mg/L (ppm).

Résultats

ET Discussion

III Résultats et discussion

III.1 Revivification et vérification de la pureté des souches halophiles extrêmes F1 et F2

Après une incubation de 7 jours des cultures sur le milieu de culture SH standard liquide à 15% de NaCl à 40°C sous une agitation de 150 rpm, nous avons remarqué l'apparition de trouble et un virage de couleur du milieu de culture du jaune clair à rouge-orange pour la souche F1 et rouge pour la souche F2 (Figure 8). Cela indique la présence d'une croissance favorable sur ce milieu et la pigmentation due à la synthèse des caroténoïdes comme la bactériorubérine (un caroténoïde à chaîne ouverte de 50 atomes de carbone) (Amr Abd El-Rhman *et al.*, 2012). Chez les *Haloarchaea* le principal pigment est la bactériorubérine. D'autres composés caroténoïdes mineurs comme le lycopène ont été identifiés à de faibles concentrations chez les archées halophiles. Les faibles concentrations de ces composés suggèrent qu'ils peuvent être utilisés comme précurseurs pour la synthèse d'autres caroténoïdes, en plus de la bactériorubérine (Naziri *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). La grande majorité des bactéries halophiles et des archées produisent des pigments caroténoïdes, présents en grande quantité dans leurs membranes (Corral *et al.*, 2019). La dense communauté d'halophiles et l'algue *Dunaliella*, également productrice de caroténoïdes, sont responsables de la coloration rose, rouge et violette caractéristique des environnements hypersalins (Oren, 2001).

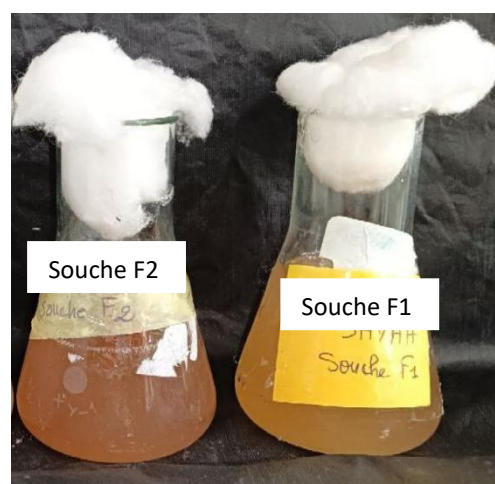


Figure 8: Aspects des cultures des souches halophiles extrêmes F1 et F2 après 7 jours d'incubation sur milieu SH standard.

✓ Caractérisation macroscopique

Après incubation sur milieu SH standard solide, des colonies de très petites tailles pigmentent (rouge-orange pour la souche halophile F1 et rouge pour la souche halophile F2) ont apparus après incubation pendant 5 jours à 40°C (Figure 9) et la description des colonies est mentionné dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5: Résultats des caractères macroscopiques des souches halophiles F1 et F2

Caractère	Souche F1	Souche F2
Taille	>1mm	>1mm
Chromogène	Orange Rouge	rouge
Consistance	Visqueuse	Visqueuse
Forme	Plate	Plate
Surface	Lisse brillante	Lisse brillante



Souche F1



Souche F2

Figure 9 : Aspect macroscopique des souches halophiles F1 et F2 après incubation sur milieu SH standard solide.

✓ Caractérisation microscopique :

L'observation au microscope photonique au grossissement x40 des souches halophiles F1 et F2 à l'état frais, montre que les deux souches sont mobiles et de forme cocci, avec un mode de regroupement isolées (Figure 10).

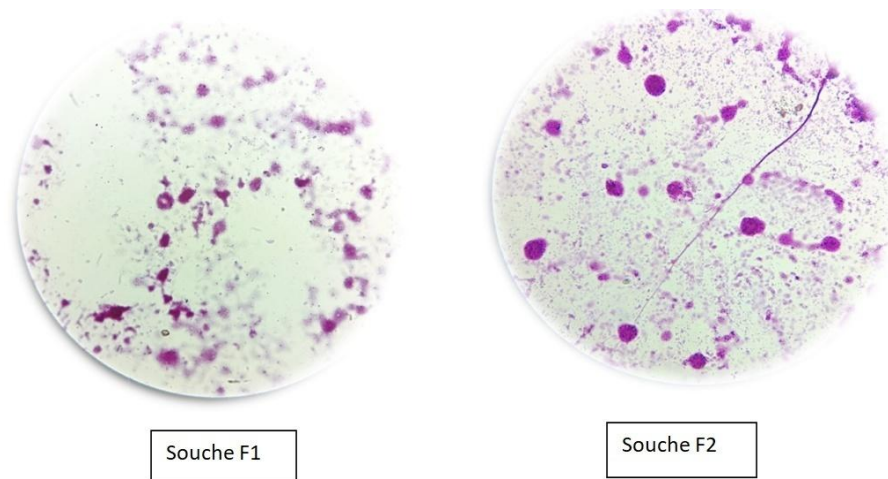


Figure 10 : Aspect microscopique des souches halophiles extrêmes F1 et F2 Gx40.

Après réalisation de la coloration de Gram modifiée des souches halophiles F1 et F2, l'observation au microscope photonique à immersion nous a permis de distinguer le type, la forme et l'arrangement des cellules. Les résultats montrent que toutes ces souches présentent un Gram négatif (cellule colore en rose), et une forme de cocci avec un mode de regroupement isolé (Figure 11).

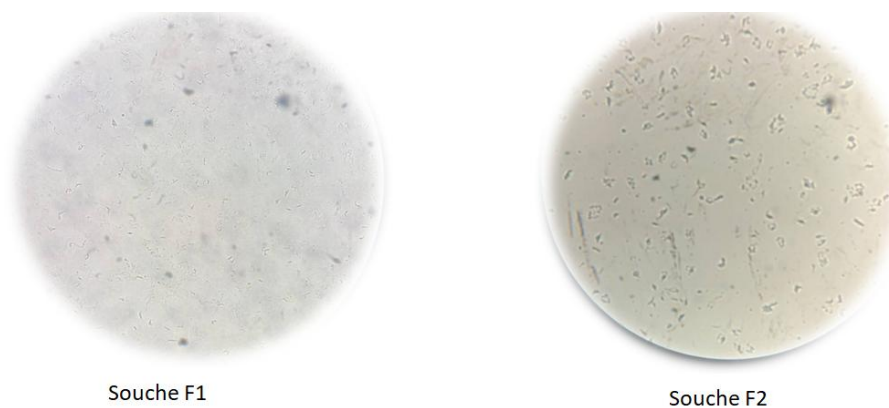


Figure 11 : Aspect microscopique des souches halophiles extrêmes F1 et F2 après coloration du Gram modifié GX40.

Les résultats obtenus des études macroscopiques et microscopiques des souches halophiles F1 et F2 confirment sa pureté, état cellulaire cruciale pour ces souches afin de conduire à bien l'étude de l'effet des métaux lourds sur sa croissance.

III.2 Effet des métaux lourds (Pb et Ag) sur la croissance des souches F1 et F2

Après revivification et vérification de la pureté des souches halophile F1 et F2, nous avons procédé à l'inoculation des cultures en batch contenant les différentes concentrations des métaux lourds testés (plomb et argent) dans un milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence d'amidon comme source de carbone.

Le suivi de la fermentation pendant 15 jours d'incubation a été évaluée par :

- L'étude de la cinétique de croissance des souches halophiles F1 et F2 en présence des métaux lourds testés (plomb et l'argent) dans le milieu SH à des concentrations variables (1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm et 6ppm pour le plomb et l'argent). Les différentes concentrations des métaux lourds ont été ajoutées en phase exponentielle soit à une DO de croissance égale à environ 0,4. Au cours de cette période, des prélèvements pour la mesure de la densité optique cellulaire (DO) ont été effectués après chaque 24h d'incubation par un spectrophotomètre (GENESYS 10S UV-VIS) à 600 nm (Bhakti *et al.*, 2016) ;
- La mise en évidence de la production de biosurfactants par les souches halophiles F1 et F2 en présence des métaux lourds testés par le calcul de l'index d'émulsification.
- et l'étude de l'effet de ces métaux lourds sur ses pigmentations.

Après 4 jours d'incubation à 40°C sous une agitation à 150 rpm, nous avons observé une apparition d'un trouble et une pigmentation rouge-orange pour la bactérie F1 et rouge pour la bactérie F2 dans les Erlenmeyers contenant les pré-cultures de chaque métal testé ce qui indique une croissance cellulaire des souches halophiles F1 et F2. Ceci montre la capacité de ces souches halophiles à tolérer les concentrations des métaux lourds testés ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1ppm) et AgNO_3 (1ppm) dans les pré-cultures.

III.2.1 Suivi de la fermentation en batch des souches F1 et F2 en présence de plomb

Le suivi de l'évolution de la croissance cellulaire de la souche halophile F1 et F2 en présence des différentes concentrations du $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en fonction du temps d'incubation, à travers les prélèvements journaliers recueillis lors de la fermentation, nous a permis de tracer les courbes représentées dans la figure 12 et 13. Les valeurs de la densité optique (DO) mesurées à 600 nm sont données dans l'annexe 3.

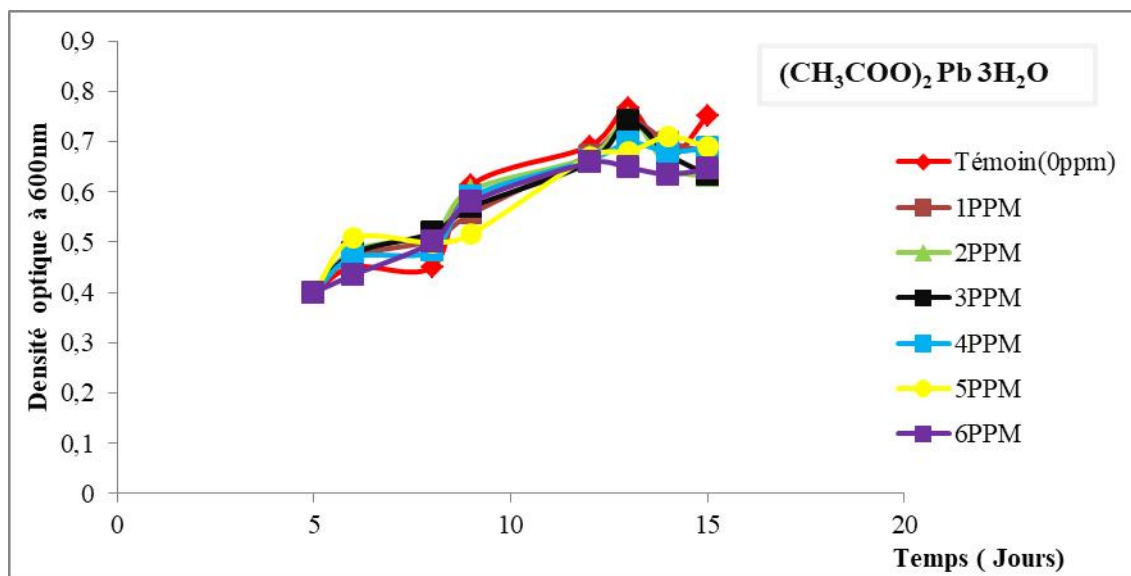


Figure 12 : Cinétique de croissance de la souche F1 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence de différentes concentrations du plomb (ppm) à 40°C à 150 rpm pendant 15 jours d'incubation.

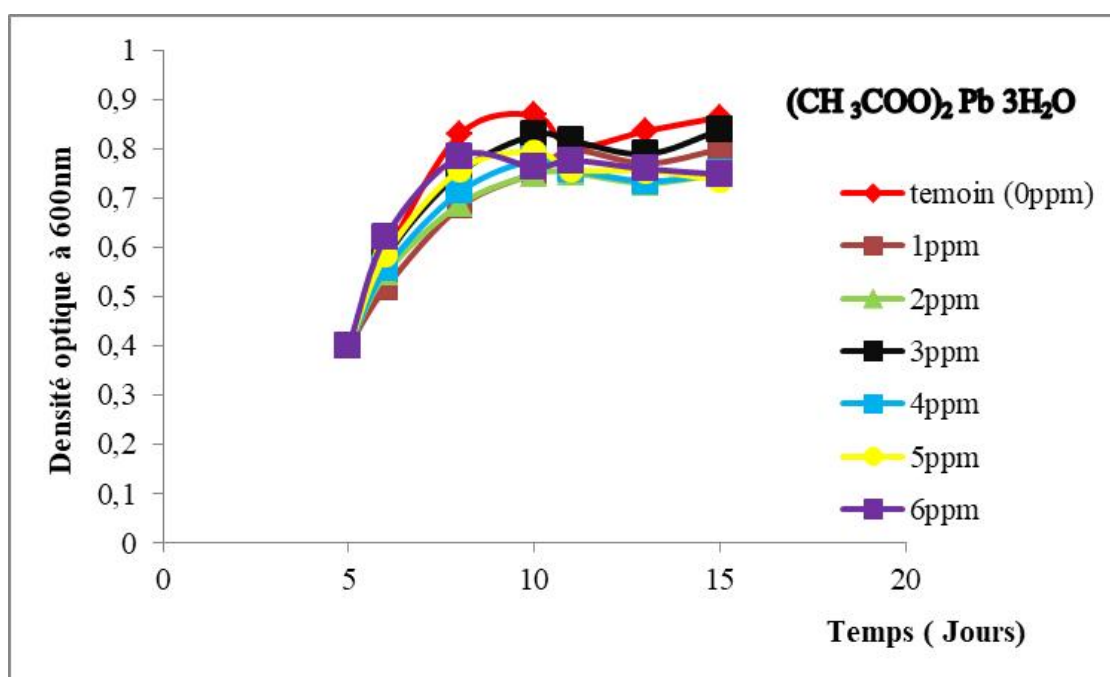


Figure 13: Cinétique de croissance de la souche F2 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence de différentes concentrations du plomb (ppm) à 40°C à 150 rpm pendant 15 jours d'incubation.

L'analyse de ces courbes montre une très bonne croissance des souches halophiles F1 et F2 en présence des concentrations 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ppm de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ qui suivent la même tendance du témoin (culture sans métal). Ces résultats suggèrent que nos souches halophiles peuvent tolérer jusqu'à une concentration de 6 ppm du plomb, avec un optimum de croissance de 2 ppm pour la souche F1 et un optimum de croissance de 3 ppm pour la souche halophile F2, dans un milieu à 15% de NaCl en présence de l'amidon comme source de carbone.

De plus, cette croissance a été accompagnée par une bonne production de biosurfactants estimée par la mesure du test E24 avec des indexes d'émulsification de 15,5%, 39,5%, 55,3%, 40,4%, 58,6% et 10,70% en présences des concentrations 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm et 6 de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pour la souche F1, respectivement (figure 14).

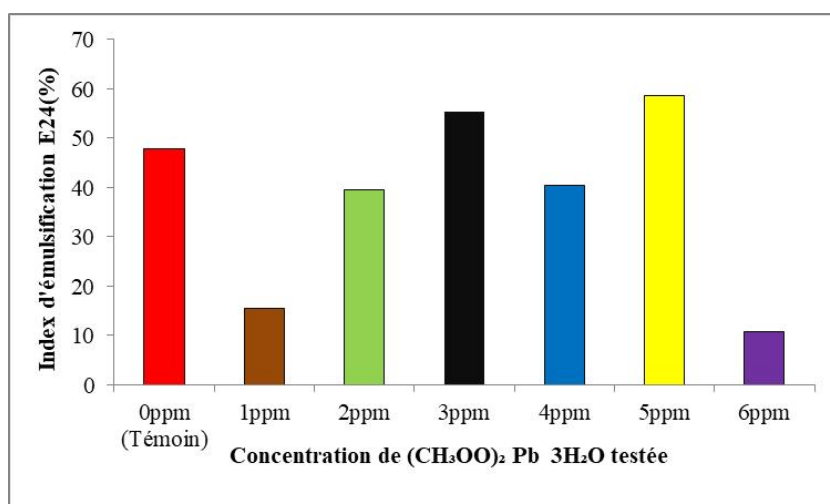


Figure 14: Résultats de l'index d'émulsification (E24) en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à différentes concentrations pour la souche F1.

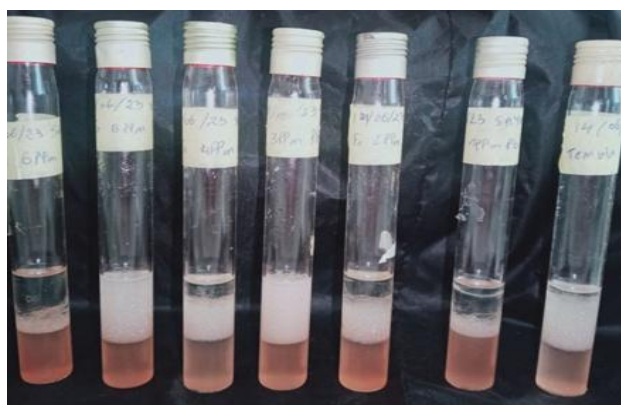


Figure 15 : Aspect des émulsions formées en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à différentes concentrations pour la souche F1.

et avec des indexes d'émulsification de 4%, 36%, 47%, 30%, 42% et 44% en présence des concentrations 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm et 6 ppm de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pour la souche F2, respectivement (figure 16).

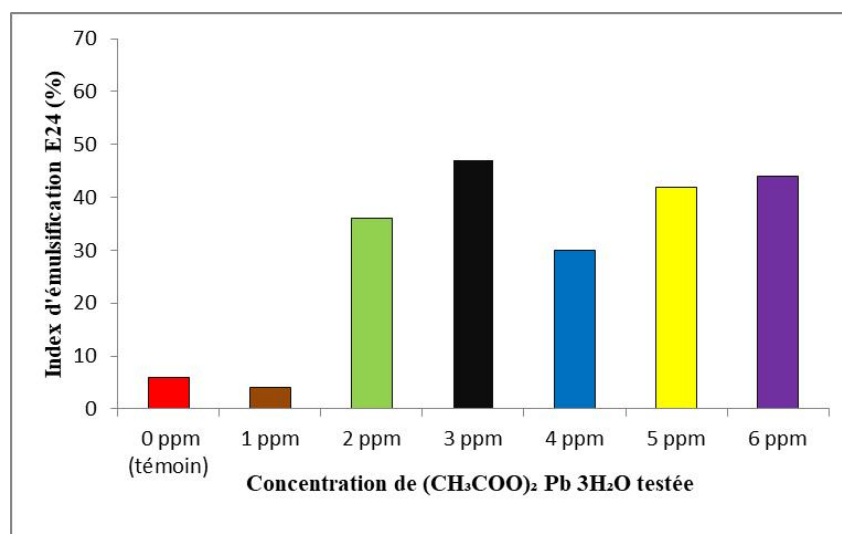


Figure 16: Résultats de l'index d'émulsification (E24) en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à différentes concentrations pour la souche F2.



Figure 17: Aspect des émulsions formées en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à différentes concentrations pour la souche F2.

En outre, nous avons aussi estimé l'effet des différentes concentrations du plomb $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sur la pigmentation cellulaire de la souche halophile F1 et F2, le solvant utilisé est l'acétone, pour une meilleure extraction de ses pigments produits lors de ses cultures en batch en présence des différentes concentrations des métaux.

L'analyse des pigments a été effectuée par des analyses spectrophotométriques à balayage entre 200 à 700 nm en utilisant des cuves en Quartz. Les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux 6 et 7.

Tableau 6 : Valeurs d'absorbance (Abs) du balayage spectral entre 200 à 700 nm des pigments produits par la souche halophile F1 en absence et en présence des différentes concentration de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, λ = longueur d'onde (nm).

Solvant	Témoin		1ppm Pb		2ppm Pb		3ppm Pb		4ppm Pb		5ppm Pb		6ppm Pb	
	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments
Acétone	310	Bacteriorubérine	310	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine	319	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine
	500	Bacteriorubérine	490	Bacteriorubérine	497	Lycopène	490	Bacteriorubérine	495	Bacteriorubérine	490	Bacteriorubérine	500	Bacteriorubérine

Tableau 7 : Valeurs d'absorbance (Abs) du balayage spectral entre 200 à 700 nm des pigments produits par la souche halophile F2 en absence et en présence des différentes concentration de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, λ = longueur d'onde (nm).

Solvant	Témoin		1ppm Pb		2ppm Pb		3ppm Pb		4ppm Pb		5ppm Pb		6ppm Pb	
	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments
Acétone	320	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine	320	Bacteriorubérine
	490	Bacteriorubérine	490	Bacteriorubérine	495	Bacteriorubérine	495	Bacteriorubérine	495	Bacteriorubérine	495	Bacteriorubérine	490	Bacteriorubérine

Le profil spectroscopique du témoin (sans métal) a montré une absorbance à 2 pics majeurs avec des maxima d'absorption à environ 310 nm et 500 nm pour la souche F1 et 320 nm et 490 nm pour la souche F2. Ces observations rejoignent celles rapportées par **Asker et Ohta (1999)**, **Yachai (2009)** et **Sahli (2021)**. En présence du plomb, la souche halophile F1 a produit différents pigments ayant des pics d'absorbance entre 310 nm et 500 nm, et entre 320 nm et 495 nm pour la souche F2. Ces derniers correspondent aux pics d'absorption de la

bactériorubérine Selon **Britton *et al.* (1995)** à l'exception de la pic d'absorbance 497 nm chez la souche F1 qui correspond au lycopène. Notons que les valeurs d'absorbances sont presque équivalentes à celles du témoin (sans métal), La similitude visuelle dans la pigmentation des cultures à différentes concentrations de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pourrait s'expliquer par des facteurs externes qui n'affectent pas nécessairement la composition des pigments eux-mêmes. Cependant, les changements observés dans les longueurs d'onde et la nature des pigments produits suggèrent que le plomb peut influencer les propriétés membranaires des souches halophiles F1 et F2 en sa présence.

III.2.2 Suivi de la fermentation en batch des souches F1 et F2 en présence d'argent

Le suivi de l'évolution de la croissance cellulaire des souches halophiles F1 et F2 en présence des différentes concentrations d'argent AgNO_3 en fonction du temps d'incubation, à travers les prélèvements journaliers recueillis lors de la fermentation, nous a permis de tracer les courbes représentées dans la figure 18 et 19. Les valeurs de la densité optique (DO) mesurées à 600 nm sont données dans l'annexe 5.

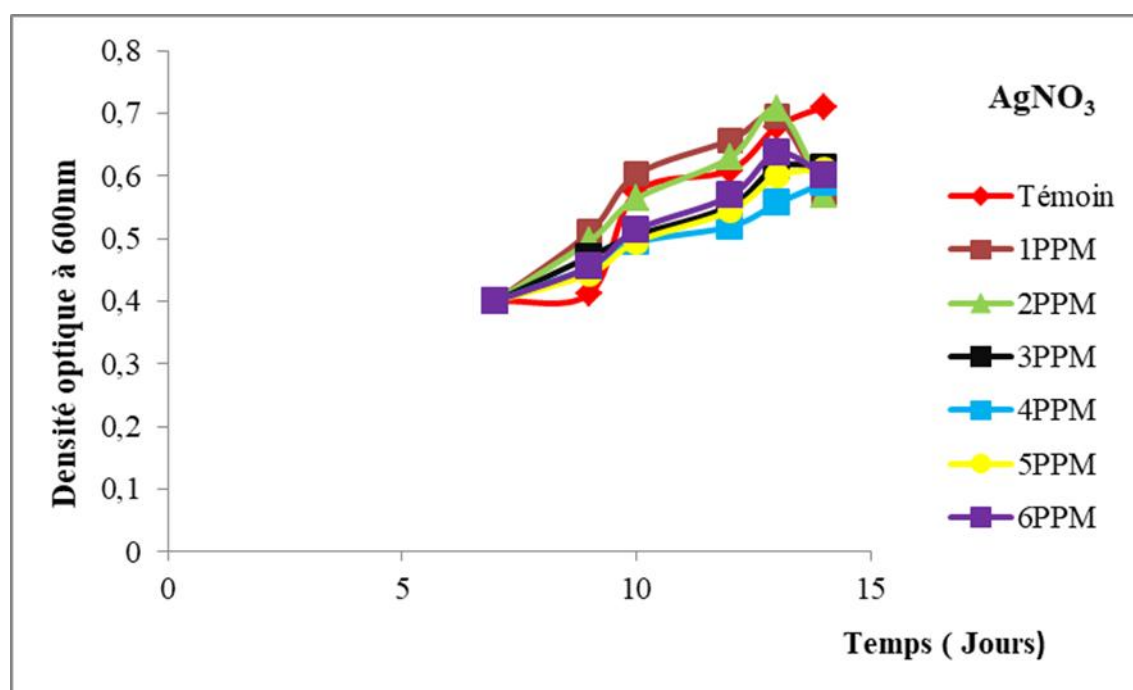


Figure 18 : Cinétique de croissance de la souche F1 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence de différentes concentrations d' AgNO_3 (ppm) à 40°C à 150 rpm pendant 15 jours d'incubation.

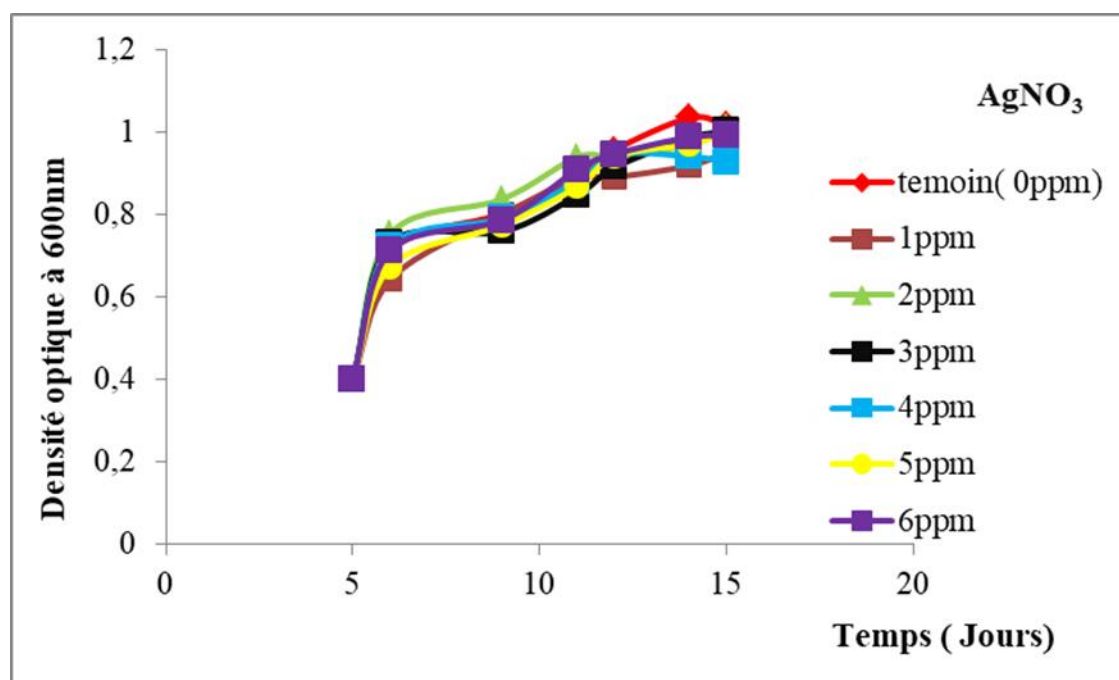


Figure 19: Cinétique de croissance de la souche F2 sur milieu SH liquide à 15% de NaCl en présence de différentes concentrations d'AgNO₃ (ppm) à 40°C à 150 rpm pendant 15 jours d'incubation.

L'analyse des courbes de croissances des souches halophiles F1 et F2 avec les concentrations de 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ppm de AgNO₃ montrent que : celle des deux premières concentrations (1ppm et 2 ppm) de la souche F1 augmentent de manière significative, tandis que les autres concentrations (3,4,5 et 6ppm) présentent une croissance moindre par rapport aux premières, au-delà de quatrième jour, une diminution de croissance est observée. Notons que contrairement aux cultures en présence d'argent, la phase de latence n'a pas été marquée par cette souche en absence de ce métal (témoin). Et celle de la souche halophile F2 toutes les courbes en présence de métal suivent le chemin de croissance de témoin. Parmi les concentrations testées, la souche halophile F1 a marqué une croissance optimale à 1 ppm et 2 ppm marquée par F2.

De plus, cette croissance a été accompagnée par une production de biosurfactants estimée par la mesure du test E24 avec des indexes d'émulsification de 2,08%, 21,2%, 18%, 42,3%, 23,07% et 57,6% en présence des concentrations 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm et 6 d'AgNO₃ pour la souche F1, respectivement (figure 20).

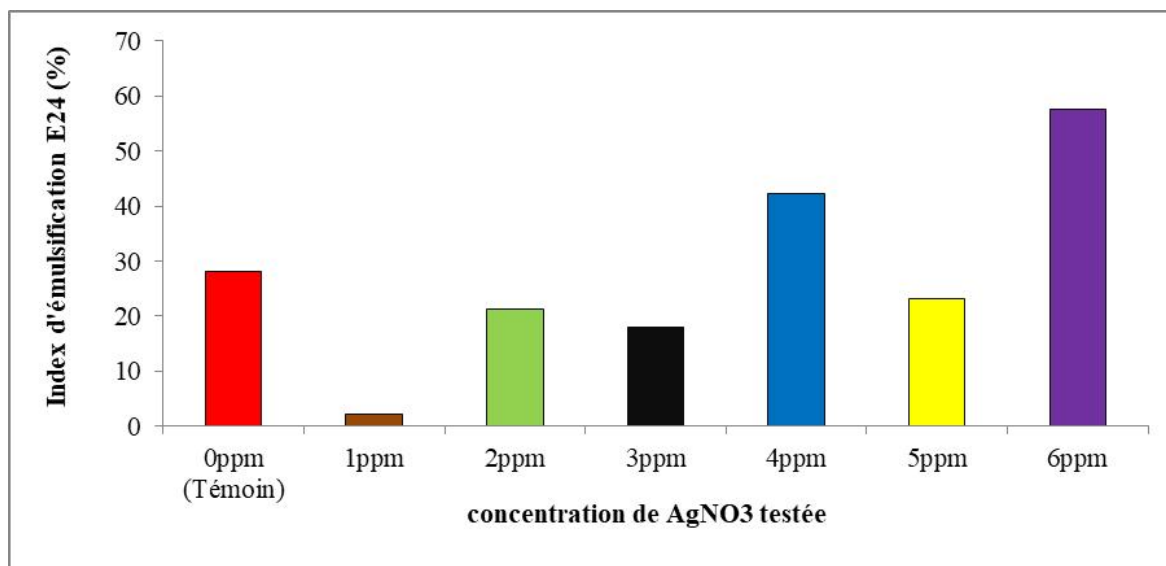


Figure 20: Résultats de l'index d'émulsification (E24) en présence d'AgNO₃ à différentes concentrations pour la souche F1.

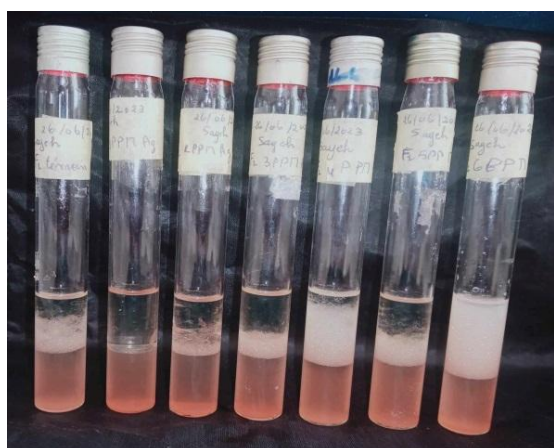


Figure 21 : Aspect des émulsions formées en présence d'AgNO₃ à différentes concentrations pour la souche F1.

et avec des indexes d'émulsification de 35,%, 21%, 38%, 8%, 28% et 38% en présence des concentration 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm et 6 ppm d'AgNO₃ pour la souche F2, respectivement (figure 22).

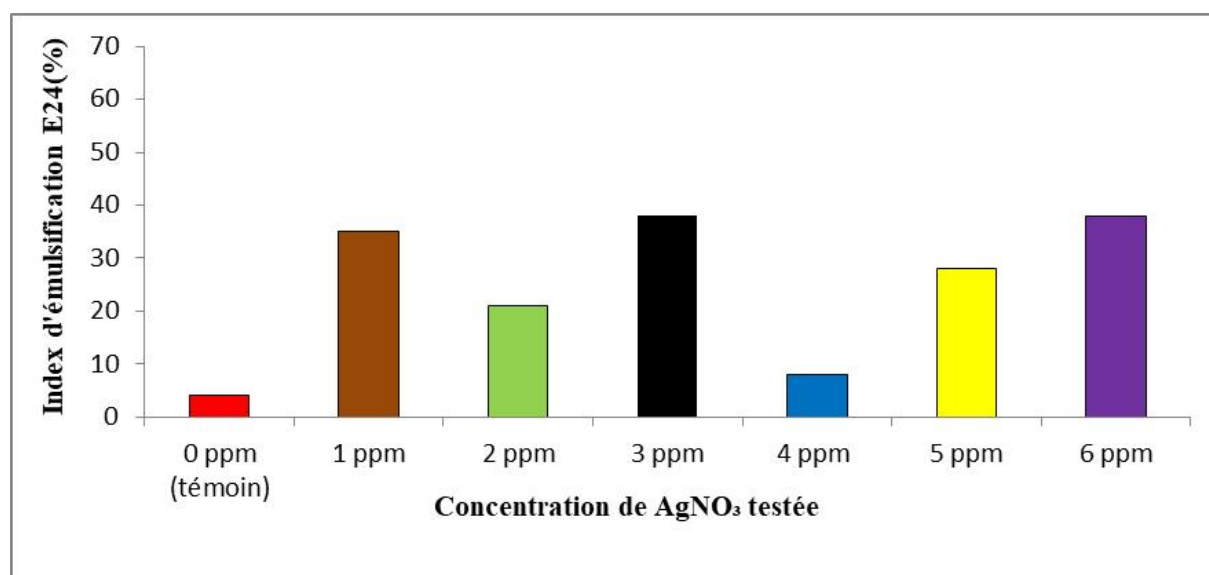


Figure 22 : Résultats de l'index d'émulsification (E24) en présence d'AgNO₃ à différentes concentrations pour la souche F2.



Figure 23 : Aspect des émulsions formées en présence d'AgNO₃ à différentes concentrations pour la souche F2.

En outre, nous avons aussi estimé l'effet des différentes concentrations d'AgNO₃ sur la pigmentation cellulaire de la souche halophile F1 et F2, le solvant utilisé est l'acétone, pour une meilleure extraction de ses pigments produits lors de ses culture en batch en présence des différentes concentrations des métaux.

L'analyse des pigments a été effectuée par des analyses spectrophotométries à balayage entre 200 à 700 nm en utilisant des cuves en Quartz. Les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux 8 et 9.

Tableau 8 : Valeurs d'absorbance (Abs) du balayage spectral entre 200 à 700 nm des pigments produits par la souche halophile F1 en absence et en présence des différentes concentration d'AgNO₃, λ= longueur d'onde (nm).

Solvant	Témoin		1 ppm Ag		2ppm Ag		3ppm Ag		4ppm Ag		5ppm Ag		6ppm Ag	
	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments
Acétone	320	Bacterio-rubérine	310	Bacterio-rubérine	319	Bacterio-rubérine	310	Bacterio-rubérine	320	Bacterio-rubérine	310	Bacterio-rubérine	320	Bacterio-rubérine
	500	Bacterio-rubérine	499	Bacterio-rubérine	490	Bacterio-rubérine	490	Bacterio-rubérine	495	Bacterio-rubérine	490	Bacterio-rubérine	490	Bacterio-rubérine

Tableau 9 : Valeurs d'absorbance (Abs) du balayage spectral entre 200 à 700 nm des pigments produits par la souche halophile F2 en absence et en présence des différentes concentration d'AgNO₃, λ= longueur d'onde (nm).

Solvant	Témoin		1ppm Ag		2 ppm Ag		3ppm Ag		4ppm Ag		5ppm Ag		6ppm Ag	
	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments	λ	Pigments
Acétone	320	Bacterio-rubérine	320	Bacterio-rubérine	320	Bacterio-rubérine	320	Bacterio-rubérine	320	Bacterio-rubérine	320	Bacterio-rubérine	320	Bacterio-rubérine
	490	Bacterio-rubérine	495	Bacterio-rubérine	495	Bacterio-rubérine	490	Bacterio-rubérine	500	Bacterio-rubérine	495	Bacterio-rubérine	495	Bacterio-rubérine

Le profil spectroscopique du témoin (sans métal) a montré une absorbance à 2 pics majeurs avec des maxima d'absorption à environ 320 nm et 500 nm pour la souche F1 et 320 nm et 490 nm pour la souche F2. Ces observations rejoignent celles rapportées par **Asker et Ohta (1999)**, **Yachai (2009)** et **sahli (2021)**. En présence d'argent, la souche halophile F1 a produit différents pigments ayant des pics d'absorbance entre 310 nm et 500 nm, et entre 320 nm et 500 nm pour la souche F2. Ces derniers pics d'absorption correspond aux caroténoïde de type bactériorubérine (C50) (Grant et Larsen, 1989 ; Oren et Rodriguez-Valera, 2001 ; Rasooli et al. 2016).

Notons que les valeurs d'absorbances sont presque équivalentes à celles du témoin (sans métal), La similitude visuelle dans la pigmentation des cultures à différentes concentrations d'AgNO₃ pourrait s'expliquer par des facteurs externes qui n'affectent pas nécessairement la composition des pigments eux-mêmes. Cependant, les changements observés dans les longueurs d'onde et la nature des pigments produits suggèrent que l'argent peut influencer les propriétés membranaires des souches halophiles F1 et F2 en sa présence.

III.3 Bioaccumulation du plomb et d'argent par les cellules bactériennes halophiles étudiée

A la fin de l'incubation des souches en présence des différentes concentrations de (CHC₃OO)₂Pb 3H₂O et AgNO₃, nous avons sélectionné les cultures qui ont montré une croissance cellulaire avec 6ppm pour la souche F1 (6ppm) et F2(6ppm). Ces cultures nous les avons centrifugés à 8000 rpm pendant 10 minutes pour séparer les cellules du milieu. Le surnageant ainsi que les témoins sans souches à des concentration de 6 ppm de (CHC₃OO)₂Pb 3H₂O et AgNO₃ ont été disposés dans des tubes coniques pour être doser par la technique SAA. Les résultats du test SAA sont présentés dans le tableau 10 :

Tableau 10 : Résultats de bioaccumulation de plomb et d'argent par la souche halophile F1 et F2 à partir du surnageant des cultures par la technique SAA utilisée par le laboratoire de CETIM.

Le sel métallique	Concentration initial inoculée du métal	Concentration du témoin dosée par SAA (témoin =milieu SH+6ppm)	Concentration résiduelle du métal dosée par SAA dans les cultures à 6ppm de métal	Concentration bioaccumulée par les bactéries du métal calculée en ôtant la concentration résiduelle de la concentration des témoins	Pourcentage d'abattement du métal dans le milieu	
Pb	6ppm =6mg/l	6,16mg/l	Souche F1	5,36mg/l	0,8 mg/l	13 mg/l
			Souche F2	4,36mg/l	1,8 mg/l	41 mg/l
Ag	6ppm =6mg/l	3,84mg/l	Souche F1	0,77mg/l	3,07 mg/l	80 mg/l
			Souche F2	0,88mg/l	2,96 mg/l	77 mg/l

Les résultats du tableau indiquent que lorsqu'on compare les témoins aux concentrations initiales, on observe que pour le plomb, la tendance est presque la même, tandis que pour l'argent, la concentration d'Ag dans le témoin a diminué. De plus, on constate que le pourcentage de réduction de l'argent est plus important que celui du plomb. On peut en conclure que nos souches halophiles sont plus résistantes à l'argent qu'au plomb.

En ce qui concerne l'efficacité des deux souches, la souche F2 a montré une meilleure réduction du plomb par rapport à la souche F1. Cependant, pour l'argent, c'est la souche F1 qui a montré une meilleure réduction du métal dans le milieu par rapport à la souche F2.

Pendant les manipulations, nous avons remarqué la formation de particules noires au fond des flacons contenant les cultures en présence d'argent figure 24. Pour confirmer leur origine, nous avons ajouté 6 ppm d'argent à un flacon contenant le milieu Sh, agissant ainsi comme un témoin.



Figure24 : Aspect de la culture avec l'argent.

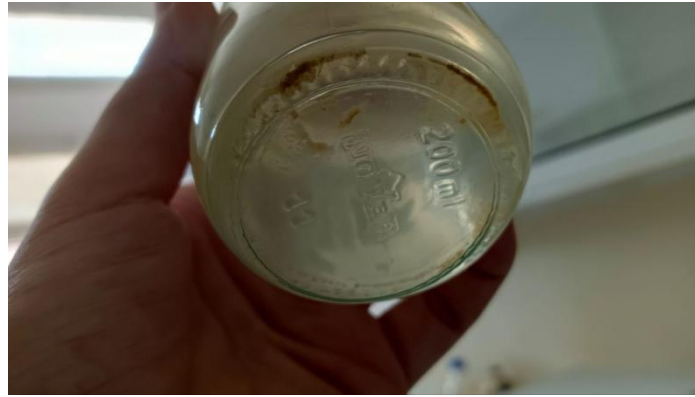


Figure25 : Aspect témoin avec 6ppm

Dans la figure25, nous avons observé la formation de particules noires au fond du flacon de témoin. Il est possible que cette observation soit due à la précipitation de l'argent en réaction à la lumière.

Discussion générale

Dans cette étude nous sommes intéressées à l'étude de l'effet des deux métaux lourds (l'argent, le plomb) à différentes concentrations (1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm et 6 ppm pour l'argent (AgNO_3) et le plomb($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) sur la croissance cellulaire, la production des pigments caroténoïdes et de biosurfactants par deux souches halophiles F1 et F2 isolées antérieurement à partir de sebkhas algériennes et identifiées comme étant des archaebactéries halophiles extrêmes, membres de la famille des *Halobacteriaceae*.

Le plomb (Pb) et l'argent (Ag) sont des métaux lourds toxiques qui peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement. Ils ne sont pas des nutriments essentiels pour les organismes vivants à des doses élevées, ils ont des effets mutagènes et reprotoxiques, altérants la fertilité et le développement de l'enfant à naître. Toutefois, il convient de noter que le cation argent (Ag) a été historiquement employé en tant qu'agent antimicrobien en raison de ses propriétés microbicides. Il se caractérise par une faible toxicité vis-à-vis des cellules humaines et démontre une activité thérapeutique significative. Son utilisation a notamment été observée dans la prévention et le traitement des brûlures ainsi que dans la gestion des infections des plaies chroniques (**Atiyeh, Bishara S., et al., 2007 ; Hosny, Alaa El-Dien MS, et al., 2019**). Ces métaux sont souvent libérés dans l'environnement en raison d'activités humaines telles que l'exploitation minière, les rejets industriels, les eaux de ruissellement agricoles et les déversements d'eaux usées. Ils ont la capacité de s'accumuler dans le sol, l'air et l'eau, ce qui accroît les risques de contamination (**Zhao et al., 2012 ; Paula et al., 2013**).

L'environnement naturel a subi une pollution croissante due à l'accumulation continue de métaux lourds et de métalloïdes. Cette pollution provient de diverses sources, notamment l'expansion rapide des activités industrielles, l'extraction minière, le rejet de déchets contenant des métaux, la dispersion de résidus chimiques issus de carburants et de peintures, l'utilisation excessive d'engrais chimiques en agriculture, le rejet de boues d'épuration, l'utilisation d'insecticides et de pesticides, l'irrigation des terres agricoles avec des eaux usées, les résidus de la combustion du charbon, les déversements d'hydrocarbures organiques, ainsi que les dépôts atmosphériques (**M. Sadrzadeh et al., 2009 ; Priyadarshane, Monika, and Surajit Das 2021**).

Jusqu'à présent, différentes méthodes, notamment les traitements physiques, chimiques et

biologiques ont été utilisés pour réduire ou éliminer les métaux lourds. Le traitement par bioremédiation utilise des micro-organismes tels que les bactéries pour le traitement des métaux lourds. L'absence de produits chimiques dans le traitement biologique pourrait être un avantage majeur (Gholizadeh, Mortaza, and Xun Hu 2021). Des processus toxicologiques dus aux métaux lourds peuvent également se produire dans les microorganismes, affectant ainsi l'abondance et la diversité des populations microbiennes ainsi que leurs activités métaboliques (Luo, L. Y., et al., 2019). Cependant, la bioremédiation des environnements salins et hypersalins pollués par les métaux lourds avec des micro-organismes conventionnels n'est pas possible en raison des salinités élevées de ces environnements qui peuvent perturber leur équilibre osmotique et dénaturer les enzymes métaboliques (Erdogmus et al., 2013). Par conséquent, il existe un besoin pressant d'isoler des microorganismes extrêmement halophiles pour la bioremédiation d'environnements hypersalins pollués par les métaux lourds (Naik et al., 2017). C'est dans cette perspective que cette étude s'est inscrite. Compte tenu des caractéristiques et du potentiel biotechnologique des halophiles extrêmes, plusieurs chercheurs se sont intéressés à étudier leur résistance *vis à vis* des métaux lourds. Abdel-Razik, Mahmoud A., et al. (2020) ont montré la résistance des bactéries halophiles par l'isolat WQL9 qui a montré une résistance élevée au plomb jusqu'à 4 mM. Sameer, et al. 2020 ont montré que parmi les cent vingt-huit isolats testés pour leur tolérance au PbUn isolat bactérien halophile *Bacillus pumilus*, s'est révélé résistant jusqu'à 900 ppm. La souche halophile *Halomonas venusta* H9 étudiée par Zmorrod, Nadine G. N. G. (2021) a montré une grande tolérance (jusqu'à 500 ppm) au plomb.

Dans une étude de Abdollahnia, M. (2020) montre que au total de 100 souches halophiles, 24 et 10 souches d'archées et de bactéries pourraient atteindre 1,0 mM d'AgNO₃, respectivement et sélectionnés pour les expériences de synthèse.

Les chercheurs Ahmad, Fiaz, et al. (2019) ont exploré le potentiel de cette nouvelle souche d'*Enterobacter cloacae* pour la remédiation de l'argent et la synthèse d'AgNP simultanées, les résultats ont montré que la souche SMP1 pouvait éliminer l'argent à toutes les températures testées et à toutes les concentrations d'argent testées (250 mg/L).

D'après nos résultats, nous avons pu mettre en évidence la résistance de nos souches halophiles F1 et F2 aux différentes concentrations d'argent (AgNO₃) et plomb (Pb(CH₃COO)₂) dans un milieu SH à 15% de NaCl en présence de l'amidon comme source de

carbone. Ces souches ont marquées une meilleure croissance cellulaire en présence de 1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm et 6ppm de plomb par rapport aux témoins (sans métal) et aux différentes autres croissances de ces souches halophiles en présence d'argent.

Une croissance optimale de 2 ppm a été constatée pour la souche F1 et de 3 ppm pour la souche halophile F2 en présence de plomb, tandis qu'en présence d'argent, la croissance optimale a été de 1 ppm pour la souche F1 et de 2 ppm pour la souche halophile F2.

Cependant, par rapport aux cultures de témoins non exposées aux métaux, nous avons observé que la présence de métaux testés (Pb) et (Ag) dans les milieux de croissance de nos souches halophiles F1 et F2 entraîne une altération de leur pigmentation. En particulier, la pigmentation rouge-orange de la souche F1 et le rouge de la souche F2 ont affecté, tout en modifiant leur profil spectrophotométrique. Nous savons que cette pigmentation rouge-orange et rouge des haloarchaeaes est attribuable aux caroténoïdes associés à la membrane, à la bactériorubérine C50 et à d'autres dérivés, qui ont été précédemment étudiés dans des références telles que **Grant et Larsen (1989)**, **Oren et Rodriguez-Valera (2001)** et **Rasooli et al. (2016)**. De plus, il est important de noter que la bactériorubérine joue un rôle crucial en protégeant les cellules contre les rayons UV, comme cela a été démontré dans des travaux antérieurs tels que ceux de Mandelli et al. (2012). D'après Hazayen et al. (2002), *Halobiforma haloterrestris* présente des maxima d'absorption à 370, 390, 494 et à 528 qui correspondent au maxima d'absorption de la bactériorubirine, une des caractéristiques majeures des archaebactéries halophiles extrêmes (**Gochbauer et al., 1972 ; Grant et al., 2001**).

La pigmentation et la capacité de croître en présence de concentrations salines élevées sont des propriétés des Archaea halophiles extrêmes (**Grant et al. 2001 cité par Kharroub, 2007**). La diminution de l'intensité du pigment et le changement faible de couleur peuvent résulter de divers facteurs, notamment des stress environnementaux causent par ces métaux, ou des adaptations à l'environnement. Les métaux lourds peuvent perturber les voies métaboliques des archées halophiles, y compris celles impliquées dans la synthèse des pigments. Similairement à notre travail l'étude de **MGBODILE, CHIOMA FLORENCE, et al., 2022** montre que des concentrations plus élevées (600 et 1000 ppm) n'inhibaient pas significativement la croissance des souches halophiles bactériennes.

Les études sur la résistance des métaux le plomb chez les bactéries halophiles réalisées par **Abdel-Razik, Mahmoud A., et al., (2020)** ont observé une augmentation nette de

l'absorption du plomb (94,5 %) et une diminution de la concentration de plomb dans le surnageant (passant de 400 ppm à 21,25 ppm), par rapport à nos souche qui ont fait l'abattement de 6mg à 4,36 qui ce n'est pas comparable mais c'est un début de test, une étude que nous avez commencé et qui est très prometteuse pour plus de concentration et d'abattement. Ces résultats étaient comparables à plusieurs travaux menés dans d'autres environnements salins du monde entier (**Khodabakhsh et al.,2011 ; Amoozegar et al., 2012 ; Huo et al., 2014 ; Moreno et al.,2012 ; Sowmya and Hatha 2017**). , par exemple, l'étude de bactéries modérément halophiles isolées d'environnements salins en Iran a révélé un schéma de résistance similaire au Pb. en outre **Nieto et al. (1989)** ont montré que toutes les bactéries modérément halophiles isolées étaient tolérantes au Ni, au Pb et sensibles à l'Ag(**Baati, Houda, et al.,2022**).

Les biosurfactants peuvent potentiellement extraire les métaux lourds par le biais de plusieurs mécanismes, notamment l'échange d'ions, la précipitation-dissolution et la complexation contre-ionique (**da Rocha Junior et al., 2018**). Ces mécanismes impliquent la formation de complexes entre les métaux et les biosurfactants, grâce à des interactions électrostatiques entre les charges négatives présentes à la surface des biosurfactants et les métaux cationiques. Ces complexes de surface réduisent la tension interfaciale dans le milieu (**Franzetti et al., 2014**).

Da Rocha Junior et al.,(2018) ont également montré que le biosurfactant brut extrait de la levure *C. tropicalis* UCP0995 est non seulement efficace pour éliminer le zinc et le cuivre du sol, mais il est également capable de former des complexes avec des cations métalliques présents dans des solutions aqueuses.

Plusieurs études ont montré le rôle des biosurfactants de nature exopolysaccharidique (des exopolysaccharides ou EPS. Les EPS produits par les halophiles présentent un potentiel dans les processus industriels. Les EPS présentent diverses propriétés telles que la floculation, l'émulsification, le biosurfactant, l'activité antimicrobienne, l'activité de gélification, etc.(**Kanekar., et al., 2022**).L'adsorption des métaux lourds par les exopolysaccharides est un processus indépendant du métabolisme, qui est attribué à l'interaction entre les cations métalliques et les charges négatives des groupes fonctionnels acides des EPS (**Voica et al., 2016**).

Lorsque nous avons travaillé avec l'Ag, nous avons remarqué l'apparition de particules noires qui décantent au fond des des cultures ainsi qu'avec le culot de cellules après la centrifugation.

Au départ nous avons soupçonné que c'était des nanoparticules d'argent biosynthétisé par les deux souches halophiles comme l'étude de **Abdollahnia, M. (2020)** qui montre que L'apparition d'une couleur brun foncé dans le milieu de culture signifie la formation probable de nanoparticules, et une capacité des archées et des bactéries halophiles a été déterminée par pour la synthèse de nanoparticules d'argent par des approches intracellulaires et extracellulaires. Mais quand nous avons contrôlé la culture témoin qui contient le milieu SH et l'AgNO₃, nous avons trouvé les mêmes particules noires mais avec une quantité moindre pour la même concentration d'Ag utilisée.

Il se peut que le sel d'Ag à réagit avec la lumière et à donné l'apparition de ces particules noires, nous n'avons pas pu travailler dans des conditions obscures recommandé lors de l'utilisation du AgNO₃ car malheureusement nos souches halophiles ont besoins de lumière pour se développer. Comme il se peut qu'il y ait eu formation de nanoparticules d'argent dans les cultures en présence des souches car la quantité de particules est visuellement plus importante ainsi que le dosage de l'Ag résiduelle à la fin de la culture à bien baissé par rapport au témoin.

Conclusion

ET

Perspectives

IV Conclusion et perspective

Le présent travail avait pour objectif l'étude de la bioaccumulation de deux métaux lourds (Argent et Plomb) par les bactéries halophiles F1 et F2.

Notre étude a comporté plusieurs éléments principaux :

- Une revivification et vérification de la pureté des souches F1 et F2 sur milieu SH liquide a 15 % de NA CL en présence de l'amidon comme source de carbone.
- Un suivi de la croissance bactérienne des deux souches en présence du plomb et d'argent dans le milieu SH a concentration variable (1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm et 6ppm)
- Une extraction des pigments pour déterminer l'effet des métaux lourds sur la pigmentation des bactéries.
- Des mesures des biosurfactants produits en présence des métaux lourds en calcule l'index d emulsification
- Réalisation de la technique de spectrophotomètre d'absorption atomique SAA pour étudier la bioaccumulation du plomb et d'argent par les cellules bactériennes halophiles étudiées.

Les résultats montrent que les colonies des souches F1 et F2 apparues après 7 jours d'incubation à 40°C sur milieu SH solide sont de petites tailles homogènes tout au long des stries, circulaires, pigmentées en rouge-orange pour F1 et rouge pour F2. Ainsi, les examens microscopiques de l'état frais et après coloration de Gram modifiée démontrent que les souches étudiées sont de forme cocci à Gram négatif, isolées et immobiles.

Les résultats obtenus après le suivi de la croissance cellulaire par le mesure de la densité optique à 600 nm pendant 15 jours d'incubation en présence des deux métaux lourds à diverses concentrations ont montré que les souches halophiles F1 et F2 présentent une bonne croissance en présence de 1ppm jusqu'à 6ppm d'Argent et de 1ppm jusqu'à 6ppm de Plomb. Ces résultats montrent la résistance de ces souches halophiles à l'Argent et au Plomb à forte salinité.

La croissance cellulaire de nos souches halophiles en présence de ces métaux lourds a été accompagnée par la production des biosurfactants. Pour la souche F1, la présence de Plomb n'a pas influencé la production des biosurfactants par contre pour la souche F2, la

présence de Plomb a augmenté la production des biosurfactants. Pour la souche F1, la présence de l'Argent n'a pas vraiment influencé la production des biosurfactants. Pour la souche F2, la présence d'Argent a influencé la production des biosurfactants. Parmi les résultats obtenus, la présence des deux métaux lourds que se soit l'Argent ou le Plomb a influencé la souche halophile F2 (augmenter) à produire des biosurfactants en comparant avec la souche F1 qui n'a pas été vraiment induite (modérée).

Pour les résultats de profil spectrophotométrique, la présence des différentes concentrations des métaux lourds n'a pas vraiment influencé les pigments caroténoïdes des souches F1 et F2 malgré qu'on a observé un changement au niveau des longueurs d'ondes qui pourrait être dû à la présence des métaux lourds que se soit l'Argent ou le Plomb au niveau de milieu de culture.

Le résultat de la bioaccumulation des deux métaux lourds par les deux souches halophiles a montré que la souche F2 est plus performante vis à vis du plomb alors que la souche F1 est plus performante par rapport à l'Argent d'un côté. D'un autre côté, l'abattement de l'Argent est beaucoup plus important que l'abattement de Plomb mais il se pourrait que ce résultat soit influencé par la formation des particules noires retrouvées au fond des cultures.

Les résultats expérimentaux obtenus sont encourageants et ouvrent des perspectives pour une éventuelle amélioration et continuation du travail.

- Il serait très intéressant d'augmenter les concentrations au-delà de 6ppm.
- Il serait bien de faire l'identification moléculaire par le séquençage de l'ARN 16s.
- Il serait intéressant d'analyser les particules noires décantées au fond des cultures en présence d'Argent pour voir elles sont constituées de quoi.
- Il serait intéressant d'analyser la mousse des biosurfactants produite par les souches pour savoir de quelle nature est-elle.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques



- Abo-Alkasem, M. I., Hassan, N. m. H., & Abo Elsoud, M. M. (2023). Microbial bioremediation as a tool for the removal of heavy metals. *Bulletin of the National Research Centre*, 47(1), 1-15.
- Acerbi, E., Chenard, C., Miller, D., Gaultier, N. E., Heinle, C. E., Chang, V. W. C., Uchida, A., Drautz-Moses, D. I., Schuster, S. C., & Lauro, F. M. (2017). Ecological succession of the microbial communities of an air-conditioning cooling coil in the tropics. *Indoor Air*, 27(2), 345-353.
- Ahalya, N., Ramachandra, T., & Kanamadi, R. (2003). Biosorption of heavy metals. *Res. J. Chem. Environ*, 7(4), 71-79.
- Ahalya, N., Ramachandra, T., & Kanamadi, R. (2003). Removal and Recovery of Heavy Metals by Biosorption. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 7(4), 71-79.
- Albers, S.-V., Vossenbergh, J. L., Driessen, A. J., & Konings, W. N. (2001). Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*, 5, 285-294.
- Amoozegar, M. A., Siroosi, M., Atashgahi, S., Smidt, H., & Ventosa, A. (2017). Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology*, 163(5), 623-645.
- Amr Abd El-Rhman, E.-B., Amal Mohamed, A. E.-R., & Ahmed Rafik, E.-M. (2012). Isolation, identification and screening of carotenoid-producing strains of *Rhodotorula glutinis*. *Food and Nutrition Sciences*, 2012.
- An, H., Tian, T., Wang, Z., Jin, R., & Zhou, J. (2022). Role of extracellular polymeric substances in the immobilization of hexavalent chromium by *Shewanella putrefaciens* CN32 unsaturated biofilms. *Science of the Total Environment*, 810, 151184.
- Anawar, H. M. (2015). Sustainable rehabilitation of mining waste and acid mine drainage using geochemistry, mine type, mineralogy, texture, ore extraction and climate knowledge. *Journal of environmental management*, 158, 111-121.
- Andrei, E. Y., Li, G., & Du, X. (2012). Electronic properties of graphene: a perspective from scanning tunneling microscopy and magnetotransport. *Reports on Progress in Physics*, 75(5), 056501.
- Antoniadis, V., & McKinley, J. (2003). Measuring heavy metal migration rates in a low-permeability soil. *Environmental Chemistry Letters*, 1, 103-106.



- Balali-Mood, M., Hefazi, M., Mahmoudi, M., Jalali, E., Attaran, D., Maleki, M., Razavi, M. E., Zare, G., Tabatabaee, A., & Jaafari, M. R. (2005). Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans. *Fundamental & clinical pharmacology*, 19(6), 713-721.
- Bang, S.-W., Clark, D. S., & Keasling, J. D. (2000). Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (phsABC) from *Salmonella enterica* serovar typhimurium in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3939-3944.
- Bayou, R., Laibe, H., Mokhbi, A., & Amira, S. E. (2012). *Bioaccumulation des métaux lourds par les bactéries* université de jijel].
- Bodour, A. A., Guerrero-Barajas, C., Jiorle, B. V., Malcomson, M. E., Paull, A. K., Somogyi, A., Trinh, L. N., Bates, R. B., & Maier, R. M. (2004). Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11. *Applied and environmental microbiology*, 70(1), 114-120.

Références bibliographiques

- Brassard, D., Tessier-Grenier, M., Allaire, J., Rajendiran, E., She, Y., Ramprasath, V., Gigueux, I., Talbot, D., Levy, E., & Tremblay, A. (2017). Comparison of the impact of SFAs from cheese and butter on cardiometabolic risk factors: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, 105(4), 800-809.
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9).
- Brown, P., Gill, S., & Allen, S. (2000). Metal removal from wastewater using peat. *Water research*, 34(16), 3907-3916.



- Cantrell, S. A., Casillas-Martínez, L., & Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *mycological research*, 110(8), 962-970.
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., & Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311(5765), 1283-1287.
- Corral, P., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. *Marine drugs*, 18(1), 33.



- da Silva Oliveira, A., Bocio, A., Beltramini Trevilato, T. M., Magosso Takayanagui, A. M., Domingo, J. L., & Segura-Muñoz, S. I. (2007). Heavy metals in untreated/treated urban effluent and sludge from a biological wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research-International*, 14, 483-489.
- DaSarma, S., & Arora, P. (2002). Halophiles. Encyclopedia of life sciences. London. *Nature Publishing Group*, 8, 458-466.
- Delgado-García, M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar-González, C. N., Contreras-Esquivel, J. C., & Rodríguez-Herrera, R. (2012). Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(13), 2575-2580.
- Dong, Y., Guo, Z., Guo, N., & Liu, T. (2019). One-step removal of calcium, magnesium, and nickel in desalination by alcaligenes aquatilis via biomineralization. *Crystals*, 9(12), 633.
- Durvasula, R., & Rao, D. S. (2018). Extremophiles: Nature's Amazing Adapters. In *Extremophiles* (pp. 1-18). CRC Press.
- Dussault, H. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of bacteriology*, 70(4), 484.



- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-23.
- Elevi Bardavid, R., Khristo, P., & Oren, A. (2008). Interrelationships between Dunaliella and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles*, 12, 5-14.



- Fernández-Luqueño, F., López-Valdez, F., & Medina-Pérez, G. (2023). *Bio and Nanoremediation of Hazardous Environmental Pollutants*. CRC Press.
- Fourest, E. (1993). *Etude des mécanismes de biosorption des métaux lourds par des biomasses fongiques industrielles en vue d'un procédé d'épuration des effluents aqueux contaminés* Grenoble 1].
- Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Kennedy, D. W., Duff, M. C., Gorby, Y. A., Shu-mei, W. L., & Krupka, K. M. (2000). Reduction of U (VI) in goethite (α -FeOOH) suspensions by a dissimilatory metal-reducing bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(18), 3085-3098.



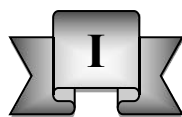
- Gadd, G. M. (2001). Accumulation and transformation of metals by microorganisms. *Biotechnology Set*, 225-264.
- Garg, R., Srivastava, R., Brahma, V., Verma, L., Karthikeyan, S., & Sahni, G. (2016). Biochemical and structural characterization of a novel halotolerant cellulase from soil metagenome. *Scientific reports*, 6(1), 39634.
- Gaur, N., Flora, G., Yadav, M., & Tiwari, A. (2014). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(2), 180-193.
- Genin, C. (2007). Le dosage spectrométrique du mercure dans l'air vers 1930. *Annals of science*, 64(4), 579-593.
- Gibtan, A., Park, K., Woo, M., Shin, J.-K., Lee, D.-W., Sohn, J. H., Song, M., Roh, S. W., Lee, S.-J., & Lee, H.-S. (2017). Diversity of extremely halophilic archaeal and bacterial communities from commercial salts. *Frontiers in microbiology*, 8, 799.
- Gohel, S. D., Sharma, A. K., Dangar, K. G., Thakrar, F. J., & Singh, S. P. (2018). Biology and applications of halophilic and haloalkaliphilic actinobacteria. In *Extremophiles* (pp. 103-136). CRC Press.
- Grandjean, P., & Landrigan, P. J. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *The Lancet*, 368(9553), 2167-2178.

Références bibliographiques

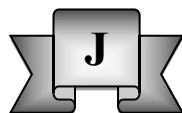
- Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R., & Mohapatra, H. (2000). Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current science*, 967-973.
- Gupta, V., Rastogi, A., Saini, V., & Jain, N. (2006). Biosorption of copper (II) from aqueous solutions by *Spirogyra* species. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296(1), 59-63.



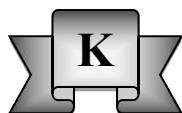
- Harding, T., Roger, A. J., & Simpson, A. G. (2017). Adaptations to high salt in a halophilic protist: differential expression and gene acquisitions through duplications and gene transfers. *Frontiers in microbiology*, 8, 944.
- Harding, T., & Simpson, A. G. (2018). Recent advances in halophilic protozoa research. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(4), 556-570.
- Hasan, S., Srivastava, P., & Talat, M. (2009). Biosorption of Pb (II) from water using biomass of *Aeromonas hydrophila*: central composite design for optimization of process variables. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2-3), 1155-1162.
- Hedi, A., Essghaier, B., Cayol, J.-L., Fardeau, M.-L., & Sadfi, N. (2014). Prokaryotic biodiversity of halophilic microorganisms isolated from Sehline Sebkhia Salt Lake (Tunisia). *Afr. J. Microbiol. Res*, 8(4), 355-367.
- Henriet, O., Fourmentin, J., Delincé, B., & Mahillon, J. (2014). Exploring the diversity of extremely halophilic archaea in food-grade salts. *International journal of food microbiology*, 191, 36-44.
- Hockin, S. L., & Gadd, G. M. (2003). Linked redox precipitation of sulfur and selenium under anaerobic conditions by sulfate-reducing bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7063-7072.
- Hozzein, W. N. (2015). Biodiversity of halophilic and halotolerant actinobacteria. *Halophiles: Biodiversity and Sustainable Exploitation*, 1-28.
- Hu, X., Wang, J., Lv, Y., Liu, X., Zhong, J., Cui, X., Zhang, M., Ma, D., Yan, X., & Zhu, X. (2021). Effects of heavy metals/metalloids and soil properties on microbial communities in farmland in the vicinity of a metals smelter. *Frontiers in Microbiology*, 12, 707786.



- Ibrahim, A. E. D. M., Hamdona, S., El-Naggar, M., El-Hassayeb, H. A., Hassan, O., Tadros, H., & El-Naggar, M. M. (2019). Heavy metal removal using a fixed bed bioreactor packed with a solid supporter. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 8, 1-7.
- Inagaki, F., Hinrichs, K.-U., Kubo, Y., Bowles, M. W., Heuer, V. B., Hong, W.-L., Hoshino, T., Ijiri, A., Imachi, H., & Ito, M. (2015). Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~ 2.5 km below the ocean floor. *Science*, 349(6246), 420-424.
- Ismail, R., Ciobanu, C. L., Cook, N. J., Teale, G. S., Giles, D., Mumm, A. S., & Wade, B. (2014). Rare earths and other trace elements in minerals from skarn assemblages, Hillside iron oxide–copper–gold deposit, Yorke Peninsula, South Australia. *Lithos*, 184, 456-477.



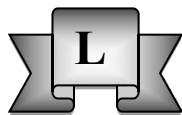
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68(1), 167-182.
- Jehlicka, J., Oren, A., & Vitek, P. (2012). Use of Raman spectroscopy for identification of compatible solutes in halophilic bacteria. *Extremophiles*, 16(3), 507-514. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0450-3>
- Jeremic, S., Beškoski, V. P., Djokic, L., Vasiljevic, B., Vrvic, M. M., Avdalović, J., Cvijović, G. G., Beškoski, L. S., & Nikodinovic-Runic, J. (2016). Interactions of the metal tolerant heterotrophic microorganisms and iron oxidizing autotrophic bacteria from sulphidic mine environment during bioleaching experiments. *Journal of environmental management*, 172, 151-161.



- Kamizela, T., & Worwag, M. (2020). Processing of water treatment sludge by bioleaching. *Energies*, 13(24), 6539.
- Kanekar, P. P., & Kanekar, S. P. (2022a). Alkaliphilic, Alkalitolerant Microorganisms. In *Diversity and Biotechnology of Extremophilic Microorganisms from India* (pp. 71-116). Springer.
- Kanekar, P. P., & Kanekar, S. P. (2022b). Metallophilic, metal-resistant, and metal-tolerant microorganisms. In *Diversity and biotechnology of extremophilic microorganisms from India* (pp. 187-213). Springer.
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2019). Bioremediation options for heavy metal pollution. *Journal of health and pollution*, 9(24), 191203.
- Kaur, C., Sivakumar, V., Zhang, Y., & Ling, E. (2006). Hypoxia-induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. *Glia*, 54(8), 826-839.
- Kebbouche-Gana, S., Gana, M., Khemili, S., Fazouane-Naimi, F., Bouanane, N., Penninckx, M., & Hacene, H. (2009). Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 727-738.
- Kiran, M. G., Pakshirajan, K., & Das, G. (2018). Heavy metal removal from aqueous solution using sodium alginate immobilized sulfate reducing bacteria: mechanism and process optimization. *Journal of environmental management*, 218, 486-496.
- Klein, J. S., & Lewinson, O. (2011). Bacterial ATP-driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence. *Metallomics*, 3(11), 1098-1108.
- Kulkarni, G. V., Salgaonkar, H. P., Sharma, P. C., Chakkarvarty, N. R., Katara, A. N., & Bhandarkar, D. S. (2016). Laparoscopic repair of left paraduodenal hernia: report of two cases and review of the literature. *Asian journal of endoscopic surgery*, 9(2), 157-160.

Références bibliographiques

Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C., & Jha, B. (2014). Salinity and desiccation induced oxidative stress acclimation in seaweeds. In *Advances in botanical research* (Vol. 71, pp. 91-123). Elsevier.



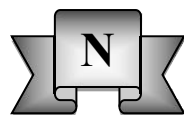
- Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J., Adeyi, O., Arnold, R., Baldé, A. B., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J. I., & Breyse, P. N. (2018). The Lancet Commission on pollution and health. *The lancet*, 391(10119), 462-512.
- Latorre, M., Cortés, M. P., Travisany, D., Di Genova, A., Budinich, M., Reyes-Jara, A., Hödar, C., González, M., Parada, P., & Bobadilla-Fazzini, R. A. (2016). The bioleaching potential of a bacterial consortium. *Bioresource technology*, 218, 659-666.
- Leung, W. C., Wong, M.-F., Chua, H., Lo, W., Yu, P., & Leung, C. (2000). Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. *Water science and technology*, 41(12), 233-240.
- Li, Q., Chai, L., Yang, Z., & Wang, Q. (2009). Kinetics and thermodynamics of Pb (II) adsorption onto modified spent grain from aqueous solutions. *Applied surface science*, 255(7), 4298-4303.
- Lima, A. I. G., Corticeiro, S. C., & Figueira, E. M. d. A. P. (2006). Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. *Enzyme and microbial technology*, 39(4), 763-769.
- Liu, C., Ma, Q., Zhou, X., Lai, H., & Li, L. (2018). Bioleaching of heavy metals from sludge by mixed strains. IOP conference series: earth and environmental science,
- Liu, S., Yang, B., Liang, Y., Xiao, Y., & Fang, J. (2020). Prospect of phytoremediation combined with other approaches for remediation of heavy metal-polluted soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 16069-16085.



- Manirethan, V., Raval, K., Rajan, R., Thaira, H., & Balakrishnan, R. M. (2018). Kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of heavy metals from aqueous solution by melanin nanopigment obtained from marine source: *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of environmental management*, 214, 315-324.
- Marchal, N., Bourdon, J.-L., & Richard, C. (1982). *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Doin Paris.
- Maret, W. (2011). Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *Biometals*, 24, 411-418.
- Martijn, J., Schön, M. E., Lind, A. E., Vosseberg, J., Williams, T. A., Spang, A., & Ettema, T. J. (2020). Hikarchaeia demonstrate an intermediate stage in the methanogen-to-halophile transition. *Nature communications*, 11(1), 5490.
- Mason, R. P. (2012). The methylation of metals and metalloids in aquatic systems. *Methylation—from DNA, RNA and histones to diseases and treatment*, 71-301.

Références bibliographiques

- Mazguene, S., Rossi, M., Gogliettino, M., Palmieri, G., Cocca, E., Mirino, S., Imadalou-Idres, N., & Benallaoua, S. (2018). Isolation and characterization from solar salterns of North Algeria of a haloarchaeon producing a new halocin. *Extremophiles*, 22, 259-270.
- McGenity, T. J., & Sorokin, D. Y. (2010). Methanogens and methanogenesis in hypersaline environments. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, 665-680.



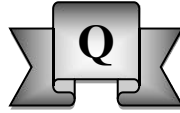
- Naja, G., Vanessa, M., & Volesky, B. (2010). Biosorption, metal, encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. In: New York: Wiley.
- Nancharaiah, Y. V., & Lens, P. (2015). Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 61-80.
- Nayak, S. S., Gonsalves, V., & Nazareth, S. W. (2012). Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar salterns in Goa, India.
- Naziri, D., Hamidi, M., Hassanzadeh, S., Tarhriz, V., Zanjani, B. M., Nazemyieh, H., Hejazi, M. A., & Hejazi, M. S. (2014). Analysis of carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126; an extremely halophilic archeon from Urmia Lake. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(1), 61.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 51, 730-750.
- Nithya, C., Gnanalakshmi, B., & Pandian, S. K. (2011). Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. *Marine environmental research*, 71(4), 283-294.



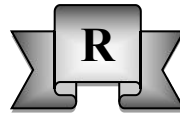
- Oren, A. (2001). The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. Saline Lakes: Publications from the 7th International Conference on Salt Lakes, held in Death Valley National Park, California, USA, September 1999,
- Oren, A. (2006). *Halophilic microorganisms and their environments* (Vol. 5). Springer science & business media.
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S., & Galinski, E. A. (2002). Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*, 6, 491-498.



- Park, J. S., & Simpson, A. G. (2015). Diversity of heterotrophic protists from extremely hypersaline habitats. *Protist*, 166(4), 422-437.
- Picard, A., & Daniel, I. (2013). Pressure as an environmental parameter for microbial life—a review. *Biophysical chemistry*, 183, 30-41.



- Qin, Q.-L., Xie, B.-B., Zhang, X.-Y., Chen, X.-L., Zhou, B.-C., Zhou, J., Oren, A., & Zhang, Y.-Z. (2014). A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. *Journal of bacteriology*, 196(12), 2210-2215.
- Quadri, I., Hassani, I. I., l'Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H., & Jebbar, M. (2016). Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 186, 119-131.
- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., & Hatti-Kaul, R. (2010). Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 1687-1696.



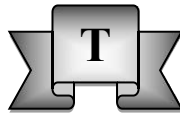
- Rai, A. K., Kumari, R., Sanjukta, S., & Sahoo, D. (2016). Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft chhurpi. *Bioresource Technology*, 219, 239-245.
- Rajendran, N. (2015). Environmental Diversity and Biological Survivability of Halophilic Bacteria. *Halophiles: Biodiversity and Sustainable Exploitation*, 173-188.
- Ramade, F., & Papigny, A. (2000). *Dictionnaire encyclopédique des pollutions: les polluants, de l'environnement à l'homme*. Ediscience international Paris.
- Ramasamy, K., Kamaludeen, & Banu, S. P. (2007). Bioremediation of metals: microbial processes and techniques. *Environmental bioremediation technologies*, 173-187.
- Raval, V. H., Bhatt, H. B., & Singh, S. P. (2018). Adaptation strategies in halophilic bacteria. In *Extremophiles* (pp. 137-164). CRC Press.
- Ren, W.-X., Li, P.-J., He, N., Fan, S.-X., & Verkhovina, E. (2007). Application of heterotrophic microorganisms in metals removal by bioleaching. *Chinese Journal of Ecology*, 26(11), 1835-1841.
- Rodriguez-Valera, F. (1992). Biotechnological potential of halobacteria. Biochemical Society Symposium,
- Roy, C., de Caumia, B., Blanchette, D., Pakdel, H., Couture, G., & Schwerdtfeger, A. E. (1994). Vacuum pyrolysis process for remediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Remediation Journal*, 5(1), 111-130.



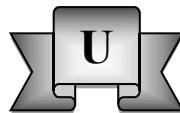
- Sag, Y., & Kutsal, T. (2001). Recent trends in the biosorption of heavy metals: a review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6, 376-385.
- Sahinkaya, E., Yurtsever, A., Toker, Y., Elcik, H., Cakmaci, M., & Kaksonen, A. H. (2015). Biotreatment of As-containing simulated acid mine drainage using laboratory scale

Références bibliographiques

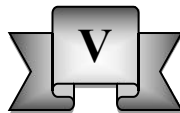
- sulfate reducing upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Minerals Engineering*, 75, 133-139.
- Sahmoune, M. N., & Louhab, K. (2010). Kinetic analysis of trivalent chromium biosorption by dead *Streptomyces rimosus* biomass. *Arab. J. Sci. Eng*, 35, 69-80.
- Sankhla, M. S., Kumari, M., Nandan, M., Kumar, R., & Agrawal, P. (2016). Heavy metals contamination in water and their hazardous effect on human health-a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* (2016), 5(10), 759-766.
- Schippers, A., Breuker, A., Blazejak, A., Bosecker, K., Kock, D., & Wright, T. (2010). The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe (II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*, 104(3-4), 342-350.
- Selatnia, A., Boukazoula, A., Kechid, N., Bakhti, M., Chergui, A., & Kerchich, Y. (2004). Biosorption of lead (II) from aqueous solution by a bacterial dead *Streptomyces rimosus* biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 19(2), 127-135.
- Setati, M. E. (2010). Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(11), 1555-1560.
- Shahid, M. J., Tahseen, R., Siddique, M., Ali, S., Iqbal, S., & Afzal, M. (2019). Remediation of polluted river water by floating treatment wetlands. *Water Supply*, 19(3), 967-977.
- Sharma, B., & Shukla, P. (2021). Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123285.
- Sharma, P. K., Balkwill, D. L., Frenkel, A., & Vairavamurthy, M. A. (2000). A new *Klebsiella planticola* strain (Cd-1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3083-3087.
- Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., & Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18, 287-296.
- Singh, S., Kumar, V., Datta, S., Dhanjal, D. S., Sharma, K., Samuel, J., & Singh, J. (2020). Current advancement and future prospect of biosorbents for bioremediation. *Science of the Total Environment*, 709, 135895.
- Singleton, P. (1999). Bacteriologie. 4e édition, Dunod, Paris. *Sciences Sup.*
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., Dirk van Elsas, J., & Wernars, K. (1999). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 65(6), 2614-2621.
- Spear, J. R., Figueroa, L. A., & Honeyman, B. D. (2000). Modeling reduction of uranium U (VI) under variable sulfate concentrations by sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3711-3721.
- Sreedevi, P., Suresh, K., & Jiang, G. (2022). Bacterial bioremediation of heavy metals in wastewater: A review of processes and applications. *Journal of Water Process Engineering*, 48, 102884.
- Srivastava, P., & Kowshik, M. (2013). Mechanisms of metal resistance and homeostasis in haloarchaea. *Archaea*, 2013.
- Sun, X., Meng, J., Huo, S., Zhu, J., & Zheng, S. (2020). Remediation of heavy metal pollution in soil by microbial immobilization with carbon microspheres. *International Journal of Environmental Science and Development*, 11(1).



- Tang, W., & Tang, A. Y. (2021). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* cysteine2/histidine2-type transcription factor 6 gene enhances plant resistance to a bacterial pathogen. *Journal of Forestry Research*, 32, 249-262.
- Thamdrup, B. (2000). Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. In *Advances in microbial ecology* (pp. 41-84). Springer.



- Umrana, V. V. (2006). Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. *Bioresource technology*, 97(10), 1237-1242.
- Uzoma, K. C., Smith, W., Grant, B., Desjardins, R. L., Gao, X., Hanis, K., Tenuta, M., Goglio, P., & Li, C. (2015). Assessing the effects of agricultural management on nitrous oxide emissions using flux measurements and the DNDC model. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 206, 71-83.



- Vakilchah, F., Mousavi, S., & Shojaosadati, S. (2016). Role of *Aspergillus niger* in recovery enhancement of valuable metals from produced red mud in Bayer process. *Bioresource technology*, 218, 991-998.
- Vera-Gargallo, B., & Ventosa, A. (2018). Metagenomic insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils from the Odiel Saltmarshes (SW Spain). *Genes*, 9(3), 152.



- Wang, J., Gong, B., Huang, W., Wang, Y., & Zhou, J. (2017). Bacterial community structure in simultaneous nitrification, denitrification and organic matter removal process treating saline mustard tuber wastewater as revealed by 16S rRNA sequencing. *Bioresource technology*, 228, 31-38.
- Wang, S., Liu, P., Chen, D., Yin, L., Li, H., & Deng, X. (2015). Silicon enhanced salt tolerance by improving the root water uptake and decreasing the ion toxicity in cucumber. *Frontiers in plant science*, 6, 759.
- Wang, X., Li, M., Shen, Y., Yang, Y., Feng, H., & Li, J. (2019). Facile preparation of loess-coated membranes for multifunctional surfactant-stabilized oil-in-water emulsion separation. *Green Chemistry*, 21(11), 3190-3199.
- Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., & Tang, M. (2009). Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of

Références bibliographiques

Lespedeza cuneata in gold mine tailings in China. *Journal of hazardous materials*, 162(1), 50-56.

Wiatrowski, H. A., Ward, P. M., & Barkay, T. (2006). Novel reduction of mercury (II) by mercury-sensitive dissimilatory metal reducing bacteria. *Environmental science & technology*, 40(21), 6690-6696.

Willacker, J. J., Eagles-Smith, C. A., Kowalski, B. M., Danehy, R. J., Jackson, A. K., Adams, E. M., Evers, D. C., Eckley, C. S., Tate, M. T., & Krabbenhoft, D. P. (2019). Timber harvest alters mercury bioaccumulation and food web structure in headwater streams. *Environmental Pollution*, 253, 636-645.



Xu, Z., Lei, Y., & Patel, J. (2010). Bioremediation of soluble heavy metals with recombinant *Caulobacter crescentus*. *Bioengineered bugs*, 1(3), 207-212.



Yang, Y., Liu, B., Du, X., Li, P., Liang, B., Cheng, X., Du, L., Huang, D., Wang, L., & Wang, S. (2015). Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. *Scientific Reports*, 5(1), 8331.

Yin, J., Chen, J.-C., Wu, Q., & Chen, G.-Q. (2015). Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology advances*, 33(7), 1433-1442.

You, W., Peng, W., Tian, Z., & Zheng, M. (2021). Uranium bioremediation with U (VI)-reducing bacteria. *Science of the Total Environment*, 798, 149107.



Zhao, S., Chen, Z., Khan, A., Wang, J., Kakade, A., Kulshrestha, S., Liu, P., & Li, X. (2021). Elevated Cr (VI) reduction in a biocathode microbial fuel cell without acclimatization inversion based on strain *Corynebacterium vitæruminis* LZU47-1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(4), 3193-3203.

Zinder, S. H., & Dworkin, M. (2006). Morphological and physiological diversity. *The prokaryotes*, 185-220.

Zuo, W., Yu, Y., & Huang, H. (2021). Making waves: Microbe-photocatalyst hybrids may provide new opportunities for treating heavy metal polluted wastewater. *Water Research*, 195, 116984.

Annexes

Annexe 1 : matériel non biologique utilisé

Les équipements	Les verreries matérielles en plastique	Les réactifs et produit utilisé
1–Etuve 2 – Spectrophotomètre UV /Visible 3– Autoclave 4 – pH mètre 5 – Agitateur –plaque chauffante 6 – Vortex 7 – Centrifugeuse à froid (SIGMA) 8 – Incubateur-agitateur. 9 – Réfrigérateur 10 – Microscope photonique 11 –Balance (SCALTEC) 12 – Bec Bunsen (Fisher) 13 – Bain Marie (MEMMERT)	Erlenmeyer de 250 ml et 1000 ml Bêcher Boite de Pétri en plastique, Pipettes Pasteur, Tubes à essai, Lames et lamelles, Seringue, seringue d’insuline Sacs en plastique, Parafilm, Micropipettes, Pincés (à bois et métallique), Cuvettes de spectrophotomètre. Flacons Barreau magnétique Tubes coniques	Acétone Gasoil Violet de gentiane Fuchsine Huile a immersion

Annexes 2 : Composition des milieux de culture SH liquide et solide pour 1 L.

Composition chimique g/l	Milieu liquide	Milieu solide
NaCl	150	150
MgCl₂ 2H₂O	160	160
K₂SO₄	5	5
CaCl₂H₂O	0,1	0,1
Extrait de levure	1	1
L’amidon	2	2
L’eaudistillée	1000	1000
Agar	/	10
Ph	7,5	7,5

Annexe 4 : Résultats de l'index d'émulsion calculer différente concentration de plomb de la souche F1 et F2.

Concentration de plomb (F2)	E24%
0ppm	6
1ppm	4
2ppm	36
3ppm	47
4ppm	30
5ppm	42
6ppm	44

Concentration de plomb (F1)	E24%
0ppm	47,8
1ppm	15,5
2ppm	39,5
3ppm	55,3
4ppm	40,4
5ppm	58,6
6ppm	10,7

Annexe 6 :Résultats de l'index d'émulsion calculer différente concentration de plomb de la souche F1 et F2

Concentration dArgent (F2)	E24%
0ppm	4
1ppm	35
2ppm	21
3ppm	38
4ppm	8
5ppm	28
6ppm	38

Concentration dArgent (F1)	E24%
0ppm	28,2
1ppm	2,08
2ppm	21,2
3ppm	18
4ppm	42,3
5ppm	23,07
6ppm	57,6

Résumé

Dans le but de mettre en évidence l'effet de Plomb et de l'Argent sur la croissance cellulaire, la production des pigments caroténoïdes, la production des biosurfactants et la bioaccumulation par les deux souches halophiles F1 et F2 par fermentation, une étude a été effectuée. Dans un premier temps, la revivification et la vérification des deux souches testées a été menée, suivie d'une étude de la cinétique de croissance en présence des deux métaux à variables concentrations, un calcul de l'index d'émulsification, une analyse des pigments caroténoïdes produits par ces deux souches et analyse de la bioaccumulation des deux métaux lourds par la technique SAA. Les souches halophiles F1 et F2 ont marqué une très bonne croissance cellulaire en présence de Plomb et de l'Argent. Au cours de cette fermentation, l'analyse spectrophotométrique montre la production de deux types de pigments "bactériorubérine et lycopène" par les deux souches F1 et F2. D'autre part, la présence des métaux testés a induit la production des biosurfactants pour la souche F2 tandis que la souche F1 n'a pas été influencée. Enfin, la souche F1 a montré une meilleure accumulation de Plomb par rapport à la souche F2 tandis que la souche F2 a montré une meilleure accumulation d'Argent par rapport à la souche F1. À la lumière de ces résultats obtenus, il s'avère que les souches F1 et F2 possèdent d'intéressantes potentialités exploitables si d'autres investigations plus poussées seront entreprises afin de consolider les résultats obtenus dans cette étude.

Mots clés : bioremediation, bioaccumulation, souches halophiles F1 et F2, Argent, Plomb, biosurfactants, pigments caroténoïdes.

Abstract

In order to highlight the effect of Lead and Silver on cell growth, carotenoid pigment production, biosurfactant production, and bioaccumulation by the two halophilic strains F1 and F2 through fermentation, a study was conducted. Initially, the revival and verification of the two tested strains were carried out, followed by an investigation of the growth kinetics in the presence of the two metals at variable concentrations, calculation of the emulsification index, analysis of carotenoid pigments produced by these two strains, and analysis of bioaccumulation of the two heavy metals using the SAA technique. Strains F1 and F2 exhibited very good cell growth in the presence of Lead and Silver. During this fermentation, spectrophotometric analysis revealed the production of two types of pigments, "bacterioruberin and lycopene," by both strains F1 and F2. On the other hand, the presence of the tested metals induced biosurfactant production in strain F2, while strain F1 was not influenced. Finally, strain F1 showed better accumulation of Lead compared to strain F2, while strain F2 showed better accumulation of Silver compared to strain F1. In light of these results, it appears that strains F1 and F2 have interesting exploitable potentials if further in-depth investigations are undertaken to consolidate the results obtained in this study.

Keywords: bioremediation, bioaccumulation, halophilic strains F1 and F2, Silver, Lead, biosurfactants, carotenoid pigments.

الملخص

من أجل إبراز تأثير الرصاص والفضة على نمو الخلايا، وإنتاج الصبغات الكاروتينويدية، وإنتاج البيوسيرفاكتانتس، وتراكم البيومنتات الثقيلة عن طريق التخمر، تم إجراء دراسة. في المرحلة الأولى، تم إعادة إحياء والتحقق من السلالتين المختبرتين، F1 و F2 بواسطة السلالتين الملحيتين لتلتها دراسة لحركة النمو في وجود المعادن الثقيلة بتركيز متغيرة، وحساب مؤشر التشتت الدهني، وتحليل الصبغيات الكاروتينويدية المنتجة من نموًا خلويًا جيدًا جدًا في وجود الرصاص F1 و F2 أظهرت السلالتان الملحيتان SAA قبل السلالتين، وتحليل تراكم المعادن الثقيلة باستخدام تقنية من ناحية F1 و F2 والفضة. خلال هذا التخمر، أظهر التحليل الطيفي إنتاج نوعين من الصبغيات "بكتيريوروبيرين وليكوبين" من قبل السلالتين تراكمًا أفضل F1 أخيرًا، أظهرت السلالة F1 بينما لم تتأثر السلالة F2 أخرى، أدى وجود المعادن المختبرة إلى إنتاج البيوسيرفاكتانتس للسلالة F1 في ضوء هذه النتائج، يبدو أن السلالتين F1 تراكمًا أفضل للفضة مقارنةً بالسلالة F2، في حين أظهرت السلالة F2 للرصاص مقارنةً بالسلالة. تحملان إمكانات مثيرة للاهتمام يمكن استغلالها إذا تم إجراء تحقيقات إضافية لتعزيز النتائج المحصل عليها في هذه الدراسة F2 و

الكلمات المفتاحية : تنقية البيئة، التراكم الحيوي، السلالات الملحية ف1 و ف2، الفضة، الرصاص، البيوسيرفاكتانت، الصبغيات الكاروتينويدية