

Année Universitaire : 2020 - 2021

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

*Bioremédiation des effluents de dinanderie*

**Présenté par** : Hakima El MOKADEM

**Encadré par** : Pr. Naïma ELGHACHTOULI

Pr. Saad IBN SOUDA

Soutenu le : 13 juillet 2021

devant le jury composé de :

- Pr. Wifak BAHAFID

-Pr. Fouad KHALIL

## **Remerciements**

Louanges à Dieu qui nous a donné la force, le courage, et la patience pour accomplir ce modeste travail.

Tout d'abord, Je tiens à exprimer toutes mes sincères gratitude, mes profonds remerciements à mes encadrants Pr. Naïma ELGHACHTOULI et Pr. Saad IBN SOUDA et pour leur grande disponibilité et leur soutien tout au long du stage

Mes vifs remerciements s'étendent également au Pr. HAGGOURD Abdellatif, Chef de Filière de la biotechnologie microbienne, pour les efforts qu'il a fourni pour nous procurer une formation solide.

Je ne saurais également oublier de remercier tous les membres de jury qui m'honorent en acceptant d'être membre de jury pour évaluer ce travail.

Finalement, Je tiens à remercier vivement tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

## **Résumé**

Les effluents de dinanderie sont parmi les effluents les plus dangereux, du fait de leur charge élevée en métaux lourds. L'objectif de cette étude est de sélectionner des microorganismes résistants aux métaux lourds et ayant un potentiel de bioremédiation pour développer un bioprocédé efficace pour le traitement de ces effluents. Les microorganismes utilisés dans cette étude ont été isolés à partir des zones polluées par les métaux lourds. Les CMI des métaux testés (Ag, Cu, Cr, Ni) des isolats étudiés ont été déterminées sur milieu solide. Les résultats obtenus révèlent des degrés de tolérance élevés et variables d'un métal à l'autre, ce qui montre que ces isolats pourraient être des bons candidats pour le traitement des sites pollués par ces métaux lourds. Les isolats les plus résistants aux métaux testés ont été sélectionnés pour évaluer leur capacité et leur efficacité dans le traitement d'un effluent synthétique de dinanderie. Les meilleurs abattements qui ont été enregistrés par nos isolats étaient de l'ordre de 62.08% pour le cuivre, 73.74 % pour le chrome, 40.32 % pour l'argent et 17.74 % pour le nickel. Le traitement de l'effluent synthétique par couplage d'un procédé chimique (coagulation ou électrocoagulation) et un procédé biologique (bioaugmentation) a montré des abattements très importants de cuivre, de chrome et de nickel qui dépassent largement les abattements obtenus par procédé biologique seul.

Les isolats microbiens ont aussi été testés pour la production de biofloculants en utilisant les déchets du bois et le marc du café comme substrats. La production des biofloculants en utilisant les déchets du bois a donné des quantités très faibles de biofloculants chez tous les microorganismes étudiés alors qu'en utilisant le marc du café, les isolats F1, F2, B7, B3, C1 et L1 ont montré des quantités relativement importantes de biofloculants extraits. Ces biopolymères pourraient être utilisés dans le traitement des eaux usées.

## **Liste des figures**

<b><u>Figure 1</u></b> : Etapes du traitement des pièces métalliques au sein d'une dinanderie.....	4
<b><u>Figure 2</u></b> : Principaux mécanismes impliqués dans l'élimination des métaux lourds par une cellule microbienne.....	10
<b><u>Figure 3</u></b> : Appareillage de jar-test.....	18
<b><u>Figure 4</u></b> : Cellule d'électrocoagulation.....	19

## **Liste des tableaux**

<b><u>Tableau 1</u></b> : Effets de certains métaux lourds sur la santé.....	6
<b><u>Tableau 2</u></b> : Composition chimique de l'effluent synthétique.....	16
<b><u>Tableau 3</u></b> : Composition chimique de la solution d'oligo-éléments.....	16
<b><u>Tableau 4</u></b> : Caractéristiques physicochimiques de l'effluent étudié comparées avec les normes Marocaines de rejets.....	23
<b><u>Tableau 5</u></b> : Teneurs en métaux lourds de l'effluent de dinanderie comparées avec les normes Marocaines de rejets.....	25
<b><u>Tableau 6</u></b> : Caractéristiques macroscopiques des colonies microbiennes des isolats étudiés.	26
<b><u>Tableau 7</u></b> : Caractéristiques microscopiques des bactéries étudiées.....	28
<b><u>Tableau 8</u></b> : CMI des isolats étudiés pour les quatre métaux testés et leur aspect morphologique en présence de ces éléments métalliques.....	28
<b><u>Tableau 9</u></b> : Taux d'abattement des métaux lourds Ag, Cu, Cr et Ni par les isolats étudiés après 7jours d'incubation.....	32
<b><u>Tableau 10</u></b> : Essais d'optimisation de la coagulation-floculation par le sulfate d'aluminium.	33
<b><u>Tableau 11</u></b> : Essais d'électrocoagulation par des plaques d'aluminium.....	34
<b><u>Tableau 12</u></b> : Taux d'abattement des métaux lourds Ag, Cu, Cr et Ni par différents traitements.....	35
<b><u>Tableau 13</u></b> : Potentiel de production des EPS par les isolats microbiens étudiés.....	35
<b><u>Tableau 14</u></b> : Taux de floculation des isolats étudiés après 24h et 48h d'incubation.....	37
<b><u>Tableau 15</u></b> : Production des biofloculants par des isolats microbiens en utilisant les déchets du bois et le marc du café comme substrat.....	38

## **Liste d'abréviations**

**DBO<sub>5</sub>** : Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours

**DCO** : Demande Chimique en Oxygène

**EPS** : Substances polymériques extracellulaire

**ETM** : Eléments traces métalliques

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**EPA** : Agence de protection de l'environnement des États-Unis

**LB** : Luria-Bertani

**MES** : Matières en suspension

**MET** : Microscopie électronique à transmission

**NTU** : Unité de turbidité néphélométrique

**Pb** : Plomb

**PO<sup>4-</sup>** : Orthophosphate

**SBR** : Sequencing Batch Reactor

**YPG** : Yeast extract, Peptone, Glucose

# *Sommaire*

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Partie I : Revue bibliographique.....</b>	<b>3</b>
<b>I- Industries de dinanderies.....</b>	<b>3</b>
1. Généralités.....	3
2. Catégorie des dinanderies .....	3
<b>II- Toxicité des métaux lourds .....</b>	<b>4</b>
1. Devenir et répartition des métaux lourds dans l'environnement aquatique .....	5
2. Effets des métaux lourds sur la santé humaine.....	5
<b>III- Procédés du traitement des effluents chargés en métaux lourds- Cas des effluents de dinanderies.....</b>	<b>6</b>
1. Méthodes physico-chimiques .....	7
2. Méthodes biologiques .....	9
2-1 Bioremédiation microbienne .....	9
2-2 Mécanismes impliqués dans la résistance et la détoxification des métaux lourds par les microorganismes .....	9
<b>Partie II : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>13</b>
<b>I- Caractérisation des effluents de dinanderie.....</b>	<b>13</b>
1. Echantillonnage .....	13
2. Caractérisation physico-chimique des échantillons prélevés de l'effluent .....	13
<b>II- Microorganismes .....</b>	<b>13</b>
1. Caractérisation macroscopique et microscopique des isolats.....	14
1-1 Etude macroscopique .....	14
1-2 Etude microscopique.....	14
<b>III- Evaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des métaux lourds des isolats étudiés .....</b>	<b>14</b>
1. Préparation des solutions mères des métaux lourds.....	15
2. Détermination des CMI des métaux lourds Cu, Ni, Ag et le Cr des isolats étudiés.....	15
<b>IV- Traitement d'un effluent synthétique .....</b>	<b>15</b>
1. Préparation de l'effluent synthétique .....	15
2. Essai du traitement biologique de l'effluent synthétique par les isolats sélectionnés (bioaugmentation) .....	17
3. Traitement de l'effluent synthétique par couplage d'un procédé chimique et un procédé biologique (bioaugmentation).....	17

3-1	Prétraitement par coagulation-floculation (Méthodes de JAR-TEST) .....	17
3-2	Prétraitement par électrocoagulation.....	19
V-	Evaluation du potentiel de production de biofloculants par des isolats microbiens	20
1-	Production des Substances polymériques extracellulaires (EPS) .....	20
2-	Production des biofloculants.....	20
2-1-	Evaluation de l'activité floculante des isolats .....	20
2-2-	Production et extraction des biofloculants.....	21
VI-	Conservation des isolats .....	22
<b>Partie III :</b>	<b>Résultats et Discussion.....</b>	<b>23</b>
I-	Caractéristiques de l'effluent de dinanderie.....	23
1.	Caractéristiques physicochimiques.....	23
2.	Teneurs en métaux lourds.....	24
II-	Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats microbiens.....	25
1.	Caractéristiques macroscopiques.....	25
2.	Caractéristiques microscopiques.....	26
III-	Evaluation de la résistance des isolats étudiés vis-à-vis les éléments métalliques Cu, Ni, Ag et le Cr.....	27
IV-	Traitement d'un effluent synthétique de dinanderie.....	31
1-	Traitement biologique de l'effluent synthétique par les isolats sélectionnés (bio-augmentation).....	31
2-	Traitement de l'effluent synthétique par couplage d'un procédé chimique et un procédé biologique (bio-augmentation) .....	32
2-1	Prétraitement par coagulation-floculation.....	32
2-2	Prétraitement par électrocoagulation.....	33
V-	Evaluation du potentiel de production de biofloculants par les isolats étudiés .....	35
1.	Production des Substances polymériques extracellulaires (EPS) .....	35
2.	Production des biofloculants.....	37
2-1	Evaluation de l'activité floculante des isolats étudiés .....	37
2-2	Production et Extraction des biofloculants .....	38
	<b>Conclusion.....</b>	<b>40</b>
	<b>Références .....</b>	<b>41</b>



## **Introduction**

Les activités artisanales (dinanderie, poterie, tanneries, textile...) occupent une place primordiale dans l'économie marocaine, elles sont parmi les secteurs les plus anciens qui représentent un héritage unique et une richesse culturelle du pays. Toutefois, ces industries engendrent des quantités énormes de rejets liquides chargés en divers polluants toxiques. Le rejet incontrôlé de ces effluents constitue une menace inquiétante pour la santé humaine et pour l'environnement.

Les rejets liquides relatifs aux industries de dinanderies sont estimés à 6000000 m<sup>3</sup> par an (Rapport sur l'état de l'environnement au Maroc, 2015). Les effluents de ce type d'industrie sont chargés essentiellement en métaux lourds (cuivre, argent, nickel) qui sont parmi les polluants les plus nocifs, de faite qu'ils persistent et s'accumulent dans l'environnement. Ils peuvent migrer vers les eaux de surface ou souterraines, comme ils peuvent pénétrer dans la chaîne trophique via les végétaux pour se retrouver dans les animaux et éventuellement dans l'homme provoquant ainsi des maladies à court et/ou à long terme (Pandey et Madhuri, 2014). Ceci impose le traitement de ces effluents avant d'être rejetés dans la nature.

Le traitement de ces effluents chargés en métaux lourds est l'une des préoccupations majeures. Jusqu'à présent, plusieurs méthodes physico-chimiques ont été proposées pour remédier à ce problème, notamment la précipitation chimique, les procédés membranaires, la coagulation, l'électrocoagulation, l'adsorption... En revanche, le coût élevé et les grandes quantités de sous-produits toxiques engendrées par ces méthodes classiques ont ouvert la voie à des méthodes biologiques innovantes, économiques et écologiques qui se basent sur l'utilisation du pouvoir épurateur naturel des microorganismes (Yang et al., 2015). En effet, plusieurs bactéries, levures et champignons ont montré leur capacité à éliminer ou à transformer les éléments métalliques en une forme moins nocive, voire non nocive (Bahafid et al., 2013 ; Li et al., 2014 ; Munees & Abdul, 2012 ; Noroozi et al., 2017).

Par ailleurs, les biofloculants provenant des sécrétions naturelles des microorganismes (les substances polymériques extracellulaire : EPS) ont également reçu beaucoup d'attention en tant qu'outil alternatif économique et plus propre qui peuvent remplacer ou compléter les procédés du traitement classiques. Ils sont plus avantageux que les agents floculants chimiques en raison de leurs propriétés inoffensives, de leur biodégradabilité de leur adaptation aux variations de pH. Cependant, le coût élevé des substrats nécessaires à la production de ces biofloculants a

limité leur application. D'où l'intérêt de trouver des substrats bon marché pour réduire le coût de production (Zhang et al., 2013).

La présente étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche CNRST (Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique), intitulé « Contribution au traitement des effluents de dinanderies de la ville de Fès par un procédé physico-chimique et biologique » coordonné par Professeur MERZOUKI Mohammed. Ce projet vise à développer un bioprocédé pour le traitement des effluents de dinanderies de la ville de Fès.

L'objectif de notre étude est de sélectionner des microorganismes performants (résistants aux métaux lourds et ayant un potentiel de bioremediation) qui seraient utilisés dans le traitement de ces effluents par bioaugmentation dans un réacteur séquentiel (SBR). Ces microorganismes sont aussi testés pour la production de biofloculants en utilisant les déchets du bois et le marc du café comme substrats.

Ce mémoire est structuré en trois parties :

**\*Partie 1 :** une synthèse bibliographique qui met le point sur des généralités sur les industries de dinanderie, la toxicité de métaux lourds et les différentes méthodes physico-chimiques et biologiques de traitement des eaux chargées en métaux.

**\*Partie 2 :** Les procédures expérimentales et les méthodes analytiques utilisées pour répondre aux objectifs de cette étude.

**\*Partie 3 :** Interprétation et discussion des différents résultats obtenus suivis d'une conclusion générale.

## **Partie I : Revue bibliographique**

### **I- Industries de dinanderies**

#### **1. Généralités**

La dinanderie est apparue au Maroc au XIIe siècle. Elle désigne la transformation artistique des métaux et d'alliages non précieux tels que le cuivre, l'aluminium, l'argent, le laiton... à l'aide de différentes techniques traditionnelles (martelage, rivetage, émaillage ...), pour la confection d'ustensiles ménagers et des objets décoratifs... D'ailleurs, Fès est parmi les villes principales où se concentrent le savoir-faire artisanal notamment dans l'ancienne Médina (Touhami et al., 2014).

#### **2. Catégorie des dinanderies**

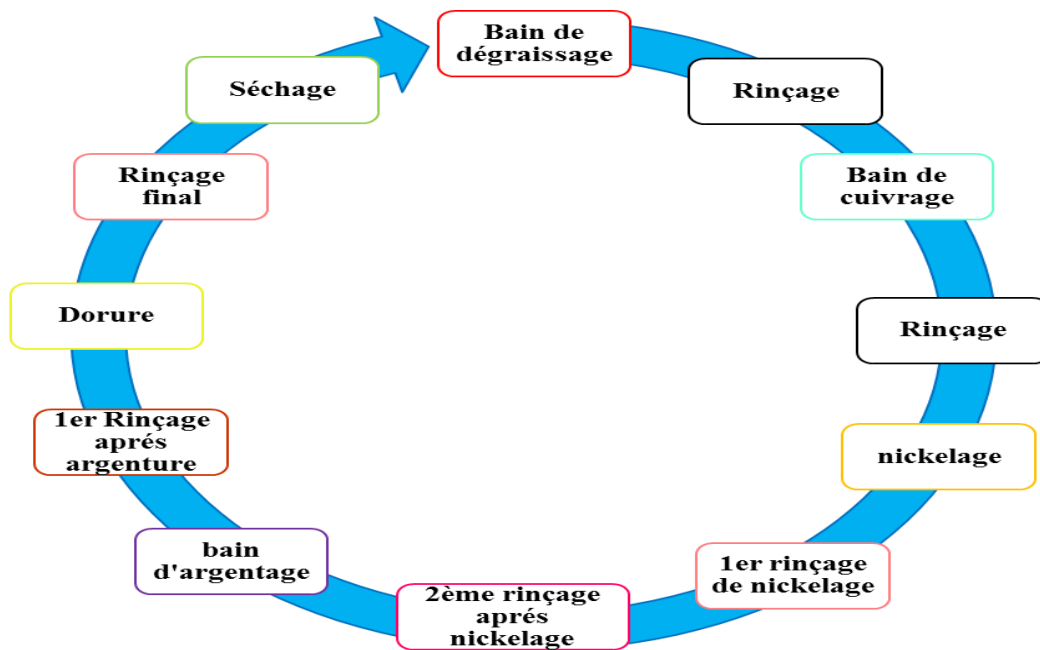
Les dinanderies sont classées en deux catégories : les dinanderies sans traitement électrolytique et les dinanderies avec traitement électrolytique. Ces dernières représentent un potentiel polluant très important par rapport au premier type.

##### **2-1 Dinanderies sans traitement électrolytique**

Ce sont des unités traditionnelles dans lesquelles la fabrication des pièces métalliques passe par différentes étapes sans traitement de surface avec électrolyse. (EL Fellah Idrissi, 2002).

##### **2-2 Dinanderies avec électrolyse**

Dans ce type d'unités, le finissage des objets métalliques fabriqués est complété par une méthode électrolytique de cuivrage, de nickelage, d'argenture et de dorure au sein des bains d'électrolyse spécifiques suivis par des rinçages à l'eau dans des bains de lavage (EL Fellah Idrissi, 2002). La figure 1 représente les étapes du traitement des surfaces de ces pièces métalliques.



**Figure 1 :** Etapes du traitement des pièces métalliques au sein d'une dinanderie (EL Fellah Idrissi, 2002).

## II-Toxicité des métaux lourds

Les effluents des dinanderies présentent une charge polluante élevée. Ils sont généralement chargés en polluants organiques et inorganiques, notamment les métaux lourds qui constituent une menace inquiétante pour la santé humaine et pour l'environnement, en raison de leur bioaccumulation dans l'organisme tous au long de la chaîne alimentaire.

Il est important de distinguer les éléments traces métalliques (ETM) essentiels qui sont indispensables pour les êtres vivants de ceux qui ne le sont pas. Les ETM essentiels (oligo-éléments) ont un rôle fondamental pour le maintien du métabolisme corporel (Pandey et Madhuri, 2014). Par exemple, le cuivre est un constituant de la cytochrome C oxydase de la chaîne respiratoire cellulaire (Namslauer et Brzezinski, 2004). Le zinc intervient dans la biosynthèse de certaines hormones notamment l'insuline et de certaines cytokines, comme il est indispensable pour l'activité de plusieurs enzymes cellulaires (phosphatase alcaline, superoxyde dismutase, alcool déshydrogénase...). Toutefois, au-delà d'une certaine concentration, la plupart des métaux deviennent toxiques. Le cadmium, le mercure, le plomb et l'arsenic sont des éléments qui ne sont pas tolérables même à des très faibles concentrations à cause de leurs effets néfastes (Klotz et al., 2003).

La toxicité des métaux lourds peut se manifester directement chez un organisme ou par accumulation le long de la chaîne trophique. Cette toxicité dépend de la forme chimique du

métal sous laquelle il existe (spéciation), sa concentration et sa biodisponibilité (Abollino et al., 2002)

### **1. Devenir et répartition des métaux lourds dans l'environnement aquatique**

Les éléments métalliques dans le milieu aquatique peuvent exister sous différentes formes chimiques (complexes, particules ou en solutions), en fonction des conditions physico-chimiques du milieu (température, pH, ions dissous, potentiel d'oxydoréduction...). Par exemple en cas de changements de pH, certains métaux dissous peuvent précipiter. Ainsi les composés organiques et inorganiques du milieu aquatique constituent des ligands qui peuvent complexer les ions métalliques, c'est ce qu'on appelle complexation organique dans le premier cas et complexation inorganique dans le second (Goff et Bonnomet, 2004).

La répartition et la distribution des métaux lourds est gouvernée par différents processus : la dilution, la dispersion, l'advection, l'adsorption/désorption, la sédimentation et certains processus chimiques (oxydation, réduction, méthylation, déméthylation...). Ces derniers peuvent être effectués par des micro-organismes et aussi par des algues (Serpaud et al., 1994).

Pour que les éléments métalliques présents dans l'environnement aquatique exercent un effet sur les organismes, ils doivent être sous des formes chimiques assimilables ayant la capacité d'atteindre les cibles biologiques et induire un effet : ce sont les formes biodisponibles (Goff et Bonnomet, 2004).

### **2. Effets des métaux lourds sur la santé humaine**

Les métaux lourds peuvent entraîner chez l'homme des pathologies graves à court et/ou à long terme et touchent son intégrité physique et mentale. Ils peuvent s'accumuler dans le corps conduisant à des perturbations du système respiratoire, rénal et digestif comme ils peuvent entraîner des troubles neurologiques graves (Pandey et Madhuri, 2014). Le tableau 1 présente les effets nocifs de certains métaux lourds sur la santé humaine.

**Tableau 1** : Effets de certains métaux lourds sur la santé.

<b>Métaux</b>	<b>Effets sur la santé</b>	<b>Références</b>
<b>Nickel</b>	Lésions hépatiques et cardiaques, diminution du poids corporel, cancers et irritation de la peau.	(Pandey et Madhuri, 2014)
<b>Cuivre</b>	Lésions hépatiques et rénales, anémie et irritation de l'estomac et des intestins.	(Pandey et Madhuri, 2014)
<b>Argent</b>	Une exposition chronique entraîne une décoloration de la peau en gris ou bleu-gris et une dégénération du foie et des reins.	(Bernhardt et al., 2010)
<b>Chrome</b>	Ulcères cutanés et dermatites. Asthme et cancers en cas d'une exposition chronique.	(Gupta & Diwan, 2017)
<b>Plomb</b>	Chez les enfants : réduction de la capacité intellectuelle, hyperactivité et des problèmes d'apprentissage, de concentration et d'attention. Chez les adultes : perte de mémoire, nausées, anorexie et insomnie.	(Padmavathiamma et Li, 2007 ; Wuana et Okieimen, 2011)

### **III- Procédés du traitement des effluents chargés en métaux lourds- Cas des effluents de dinanderies**

Le traitement de ce type d'effluents est devenu un problème de plus en plus préoccupant. Jusqu'à présent, plusieurs méthodes physico-chimiques et biologiques ont été proposées.

### **1. Méthodes physico-chimiques**

Ces méthodes se basent sur l'utilisation des propriétés physico-chimiques des polluants ou du milieu à dépolluer afin de concentrer les éléments polluants et de les séparer/extraire par la suite (Roy et al., 1994).

#### **1-1 Précipitation chimique**

La précipitation chimique est l'une des méthodes les plus employées dans le traitement d'effluents chargés en métaux lourds. Elle consiste à précipiter les éléments métalliques dissous dans la solution à traiter par des réactifs chimiques spécifiques ou par variation du pH pour former des précipités insolubles sous forme de sulfures, d'hydroxydes, de phosphates et de carbonates qui peuvent être ensuite éliminés par décantation ou par filtration (Fu et Wang, 2011; Kurniawan et al., 2006).

La précipitation sous forme d'hydroxydes est la plus employée en raison de la simplicité de sa mise en œuvre, la facilité du contrôle du pH et le faible coût du réactif précipitant (chaux) (Gunatilake, 2015).

La précipitation sous forme de sulfures permet d'avoir un degré de traitement plus important que celui de la précipitation sous forme d'hydroxydes mais les métaux sous forme de sulfures peuvent former des colloïdes qui posent des problèmes lors de l'étape de séparation (décantation ou filtration). De plus, dans un milieu acide, l'utilisation des sulfures provoque la formation du gaz H<sub>2</sub>S qui est très toxiques (Fu et Wang, 2011).

Le plus grand inconvénient de cette méthode est le volume important de boue engendré (Dąbrowski et al., 2004).

#### **1-2 Filtration membranaire**

Les Procédés membranaires est parmi les techniques les plus utilisées dans le traitement des effluents industriels chargés en métaux lourds grâce à la facilité de sa mise en œuvre. Ils sont basés sur l'utilisation des membranes semi-perméables sur lesquelles les polluants seront retenus. Selon la taille et le type du polluant, on distingue différents types de filtration membranaire : la microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse (Dula et Duke, 2019).

#### **1-3 Coagulation – floculation**

C'est une technique rapide et simple. Elle se base sur l'utilisation des agents coagulants pour neutraliser les charge négatives des particules en suspension, et des agents floculants pour que

## *Revue bibliographique*

les particules neutralisées s'agglomèrent entre elles sous forme de floccs lourds qui peuvent être éliminés par décantation ou filtration (Semerjian et Ayoub, 2003).

Les coagulants métalliques qui sont souvent employés sont de deux types : des coagulants à base de fer et des coagulants à base d'aluminium dont le sulfate d'aluminium est le plus utilisé (Dula et Duke, 2019). Goswami et Mazumder. (2014) ont montré que le sulfate d'aluminium a éliminé 30-37% de la DCO, 38-46% des matières en suspension et 74-99% du chrome. Il a aussi été montré que le choix du réactif dépend de son efficacité et de son coût. Récemment, les biocoagulants et les biofloculants ont attiré une grande attention des biotechnologistes grâce à leurs propriétés inoffensives, à leur biodégradabilité et à leur large adaptation aux variations du pH. Toutefois, le coût élevé des substrats nécessaires à la production de ces biofloculants a limité l'application de cette nouvelle approche. D'où l'intérêt de trouver des substrats alternatifs à faible coût tels que les déchets agricoles (Zhang et al., 2013).

### **1-4 Électrocoagulation**

C'est une technique électrochimique dérivée de la coagulation chimique standard, elle se base sur la séparation électrochimique des polluants par l'utilisation des anodes solubles qui sont souvent en aluminium ou en fer. Aucun ajout des produits chimiques n'est effectué car les ions métalliques actifs proviennent directement de la dissolution des anodes. D'ailleurs, les hydroxydes métalliques qui sont formés lors de l'électrolyse ont une très grande habilité pour l'adsorption des polluants (Aoudjehane et al., 2010).

### **1-5 Adsorption**

C'est l'une des techniques les plus efficaces pour le traitement des effluents contaminés par les métaux lourds, elle consiste à utiliser des matériaux spécifiques pour fixer les polluants à leur surface par des liaisons entre les ions de l'adsorbant et les ions de l'adsorbat (les polluants) (Malwade et al., 2016).

Les matériaux d'adsorption utilisés dans ce processus peuvent être naturels ou synthétiques, tels que le charbon actif produit par carbonisation des matières organiques, c'est l'un des adsorbants les plus utilisés et les plus privilégiées, mais à cause de son coût élevé son application est limitée. De ce fait, il faut chercher d'autres adsorbants à faible coût et efficaces tels que les sous-produits industriels, les déchets agricoles (déchets du thé et du café, les coquilles d'arachide...) et les cellules microbiennes (bactéries, levures et champignons) pour remplacer le charbon actif commercial (Amarasinghe et Williams, 2007).



## **2. Méthodes biologiques**

Actuellement, les recherches sont orientées vers des méthodes biotechnologiques pour le traitement des eaux usées, qui se basent sur l'utilisation des microorganismes (Bactéries, levures, champignons...), des algues ou des plantes (phytoremédiation). Ce sont des méthodes efficaces, économiques et plus respectueuses de l'environnement que les méthodes physico-chimiques classiques qui sont souvent associées à plusieurs inconvénients, à savoir la consommation élevée d'énergie et la générations d'une grande quantité de sous-produits toxiques (Yang et al., 2015).

### **2-1 Bioremédiation microbienne**

La bioremédiation est une technique innovante et prometteuse, elle se base sur la dépollution des eaux usées sous l'action des microorganismes. Ce processus consiste à activer la capacité naturelle de certains microorganismes à éliminer le polluant ou à le transformer en une forme moins nocive, voire non nocive grâce à la grande diversité fonctionnelle et génétique de ces microorganismes (Ndeddy Aka et Babalola, 2016).

Les microorganismes utilisés dans cette technologie sont soit des souches indigènes qui sont déjà présents dans le milieu à dépolluer en les stimulant par l'ajout des éléments nutritifs limitants et des accepteurs d'électrons (oxygène, source de carbone, d'azote...), c'est ce qu'on appelle la biostimulation, soit des souches ou des consortiums microbiens exogènes sélectifs, bien définis et compétents pour améliorer et appuyer la dépollution de l'effluent à traiter : c'est la bioaugmentation (Santos et al., 2011).

### **2-2 Mécanismes impliqués dans la résistance et la détoxification des métaux lourds par les microorganismes**

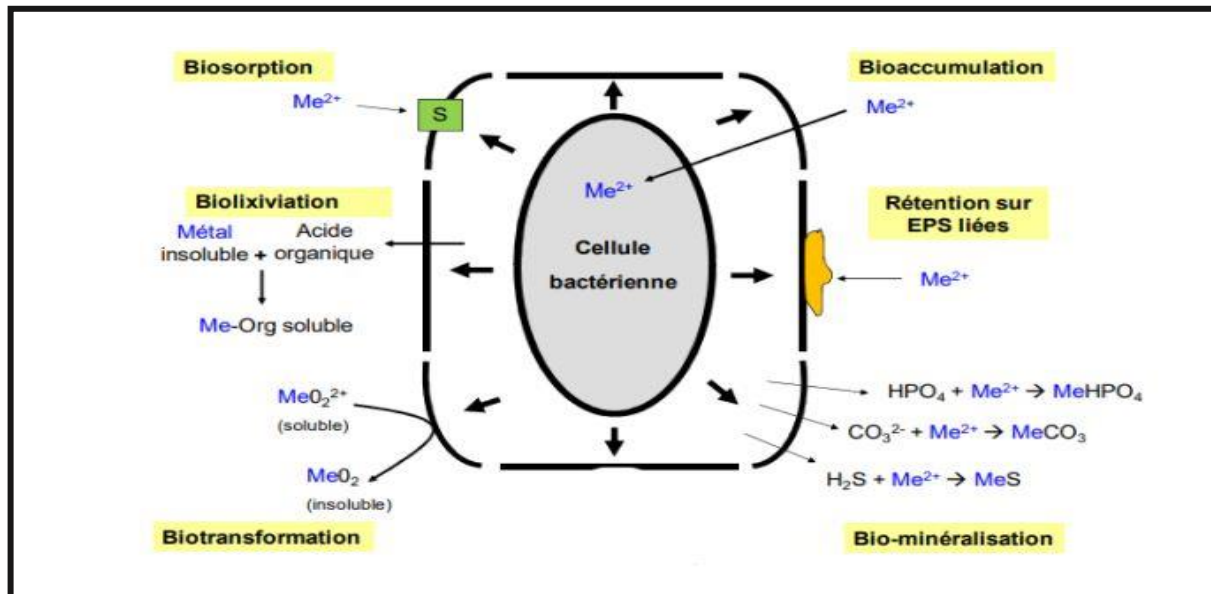
Dans des conditions du stress métallique, certains micro-organismes adoptent différents types de mécanismes (induits ou intrinsèques) pour résister et survivre dans des concentrations toxique de métaux (Gadd, 1992). Ces principaux mécanismes sont résumés dans la figure 2.

Les interactions entre les cellules microbiennes et les ions métalliques sont gouvernées par des mécanismes passifs ou actifs :

- \* Les mécanismes passifs sont rapides et réversibles, ils sont indépendants du métabolisme et de l'état physiologique de la cellule (morte ou vivante).

## Revue bibliographique

- \* Les mécanismes actifs sont plus lents et généralement inductibles, ils sont dépendants du métabolisme de la cellule, et donc spécifiques à chaque souche (Haferburg et Kothe, 2007).



**Figure 2:** Principaux mécanismes impliqués dans l'élimination des métaux lourds par une cellule microbienne (Juwarkar et Yadav, 2010). S correspond aux groupements fonctionnels présents sur la paroi,  $Me^{2+}$  correspond à un cation métallique, Org correspond à un composé organique.

- **Biosorption**

C'est un mécanisme physico-chimique de séquestration passive des métaux. Il consiste à fixer et à concentrer les ions métalliques par des cellules microbiennes vivantes ou mortes sur leur paroi cellulaire en raison de sa composition, qui est constitué de divers groupements fonctionnels : des groupes carboxyles, amines, hydroxyles, carbonyles... Ce qui rend ces cellules capables de lier et de retenir les ions métalliques en formant des complexes chimiques (Ramrakhiani et al., 2016 ; Li et al., 2018).

Yilmaz (2003) a signalé que les cellules bactériennes mortes ont la même capacité d'adsorption, ou même plus que les cellules vivantes. L'utilisation des cellules mortes est plus avantageuse que les cellules vivantes car elles peuvent être manipulées et stockées facilement, elles ne nécessitent pas un système de culture et elles ne sont pas affectées par les déchets toxiques (Ziagova et al., 2007).

Les substances polymériques extracellulaires (EPS) sont considérées comme des biosorbants efficaces, car elles sont riches en groupements fonctionnels chargés négativement (phosphoryle, carboxyle, hydroxyle, sulfhydryle...) qui se lient fortement aux cation

## *Revue bibliographique*

métalliques (Gupta et Diwan, 2017; Hussein et al., 2019). En effet, plusieurs études ont montré l'utilisation de ces biopolymères dans l'élimination des métaux lourds des eaux usées. Pathak et al. (2015) ont utilisé 1,48 g/L des EPS de *Pseudomonas aeruginosa* IASST201 pour l'élimination des éléments métalliques suivants : Cu, Pb, Zn, Ni et Cd.

La biosorption présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes classiques d'élimination des métaux lourds (Abbas et al., 2014), à savoir :

- Production moins chère de biomasse.
- Adsorption d'une large gamme d'ions métalliques.
- Traitement de grands volumes d'eaux usées.
- Adaptation à une large gamme de températures et de pH.
- Désorption facile et moins coûteuse des métaux liés à la biomasse.

- **Bioaccumulation**

C'est un processus actif qui nécessite de l'énergie métabolique. Elle consiste à absorber et à concentrer le métal dans tout ou une partie de la cellule sous forme inerte pour diminuer sa toxicité. Il s'effectue en deux étapes : d'abord, les éléments métalliques sont adsorbés à la surface extracellulaire, puis des systèmes de transport interviennent pour faire entrer les métaux à l'intérieur de la cellule avec une dépense d'énergie. Les ions métalliques incorporés dans la cellule microbienne sont liés à des structures ou à des ligands intracellulaires, ou précipités par voie intracellulaire (Kikuchi et Tanaka, 2012). A titre d'exemple, *Ralstonia metallidurans* CH34 a pu réduire le sélénite sous forme de sélénium élémentaire et elle l'a accumulé sous forme de nodules au niveau du cytoplasme (Sarret et al., 2005).

La bioaccumulation des métaux lourds dans les cellules microbiennes peut être évaluée par microscopie électronique à transmission (MET). En effet, ce mécanisme a été démontré chez plusieurs bactéries, à savoir : *Thiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* pour l'accumulation, respectivement de l'argent, le chrome et le cadmium (Munees et Abdul, 2012)

## *Revue bibliographique*

- **Biotransformation**

C'est la modification chimique des ions métalliques d'une forme toxique à une forme moins voire non toxique par des mécanismes d'oxydoréductions ou par alkylation. En effet plusieurs microorganismes peuvent utiliser ces métaux comme accepteurs ou donneurs d'électrons selon leur état d'oxydation (Ledin, 2000).

Nagvenkar et al. (2010) ont signalé que les bactéries *Micrococcus sp* et *Acinetobacter sp* peuvent oxyder l'As(III) en une forme moins soluble et inoffensive As(V). De plus, dans une autre étude, les bactéries *Bacillus sp* ont montré une résistance aux ions de mercure grâce à leur enzyme mercurique réductase qui réduit l'ion mercurique en mercure. Ce dernier est ensuite expulsé vers le milieu extérieur via la membrane cellulaire (Noroozi et al., 2017).

- **Bio-minéralisation**

C'est un mécanisme de précipitation extracellulaires des ions métalliques, par des anions carbonates, sulfates ou phosphates sécrétés par des microorganismes, ce qui permet l'immobilisation de ces métaux et par la suite la diminution de leur biodisponibilité et de leur toxicité (Li et al., 2014).

Li et al. (2014) ont rapporté que le champignon *Neurospora crassa* (champignon uréase positif) a pu précipiter le  $Cd^{2+}$  sous forme de  $CdCO_3$ . La diffractométrie de rayons X (DRX) a montré des précipités ( $CdCO_3$ ) avec des tailles qui varient entre 55 et 870 nm.

- **Biolixiviation**

C'est une technique de bio-hydrométallurgique qui se base sur la solubilisation des métaux contenus dans les sols, les sédiments et les boues de station d'épuration par des microorganismes acidophiles en aérobie ou en anaérobie (Kikuchi et Tanaka, 2012).

Dès les années 1990, les boues des stations du traitement des eaux usées sont l'objet de plusieurs études, afin de les détoxifier des éléments métalliques pour les exploiter comme amendement agricole (Marchenko et al., 2018). En effet une étude a montré une biolixiviation importante des métaux contenus dans des boues secondaires prélevés à partir d'un réacteur biologique séquentiel (SBR) par des souches de Thiobacilles présents naturellement dans les boues (81-99% du Cd, 20-31% d'Al, 91-97% du Zn 17-43% du Cr, 66-84% du Ni, 90-100% du Mn, 13-49% du Fe, 20-44% du Pb et 85-97% du Cu) (Benmoussa et al., 1994). Une autre étude récente a signalé que le champignon *Penicillium chrysogenum F1* a pu solubiliser 60,4% du Zn, Cu, Pb et Cd contenus dans un sol contaminé (Deng et al., 2019)

## **Partie II : Matériel et méthodes**

### **I- Caractérisation des effluents de dinanderie**

Avant de procéder au traitement de l'effluent étudié, une caractérisation approfondie des paramètres physico-chimiques et métalliques est nécessaire pour évaluer le niveau de la pollution dans cet effluent et identifier les principaux polluants, afin de choisir la méthode la plus adéquate et efficace pour le traitement.

#### **1. Echantillonnage**

Des échantillons des effluents de dinanderie ont été prélevés au niveau d'une société des artisans de dinandiers de Fès à Bensouda, dans des flacons neufs en polyéthylène. Ils ont été acheminés immédiatement au laboratoire et conservés au réfrigérateur à 4°C pour des traitements ultérieurs.

#### **2. Caractérisation physico-chimique des échantillons prélevés de l'effluent**

Pour apprécier les caractéristiques physico-chimiques de l'effluent étudié, plusieurs paramètres ont été analysés à savoir : pH, Conductivité, Température, MES, demande chimique en oxygène (DCO), demande biochimique en oxygène pendant 5 jours (DBO5), les formes azotés (nitrates, ammonium), les ions sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) et les ions phosphates ( $\text{PO}_4^{2-}$ ). Ces analyses ont été effectuées au sein du laboratoire de Biotechnologie de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès sous la responsabilité du professeur Mohammed Merzouki en collaboration avec la cité d'innovation.

Le dosage des métaux lourds suivants : argent, cadmium, cobalt, nickel, cuivre, zinc, chrome total, plomb total, et le fer a été effectué à la cité d'innovation par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-AES).

### **II-Microorganismes**

Les microorganismes utilisés dans cette étude sont des isolats d'une collection du Laboratoire de la FSTF « Biotechnologie microbienne » (9 Bactéries : B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 et 3 levures : L1, L2, L3 et un champignon C1) isolés dans le cadre des travaux précédents, à partir des zones polluées par les métaux lourds.

## ***Matériel et méthodes***

### **1. Caractérisation macroscopique et microscopique des isolats**

#### **1-1 Etude macroscopique**

Cette étude permet une première caractérisation des isolats, selon l'aspect morphologique des colonies (forme, taille, couleur, contour, opacité...) dans le milieu solide Luria-Bertani (LB) pour les bactéries et dans le milieu YPG (Yeast extract, Peptone, Glucose) pour les levures et les champignons.

#### **1-2 Etude microscopique**

La méthode de la coloration de Gram a été effectuée pour déterminer la forme (bacilles, coques...) et le type de gram de chaque bactérie (positif ou négatif). Après avoir préparé des frottis bactériens sur des lames de microscope de chacune des 9 souches bactériennes, à partir des cultures fraîches de 24h, les frottis ont été fixés par la chaleur, puis recouverts par des gouttes du cristal violet (colorant primaire) pendant 30 secondes à une minute, ensuite la lame a été rincée à l'eau. Puis, un mordant (le Lugol) a été ajouté et après une minute, les lames ont été soigneusement rincées à l'eau et rapidement décolorées avec de l'alcool (95%) pendant 15 secondes. Finalement, les frottis ont été recolorés par la Fuchsine (colorant secondaire) pendant une minute et rincés une dernière fois à l'eau. Les lames ont été ensuite séchées et observées au microscope optique en utilisant de l'huile à immersion. Des cellules de couleur rose indiquent que la bactérie est à gram-négative alors que des cellules de couleur violet indiquent que la bactérie est à gram-positive.

### **III- Evaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des métaux lourds des isolats étudiés**

La CMI d'un métal est la plus faible concentration qui inhibe la croissance visible d'un microorganisme donnée (Filali et al., 2000).

Le choix des métaux testés n'était pas aléatoire, mais en se basant sur les résultats des analyses physicochimiques et métalliques des échantillons des effluents de dinanderie qui ont montré des concentrations importantes de cuivre, d'argent et de nickel, qui dépassent largement les normes marocaines de rejets.

Le chrome hexavalent a été également étudié malgré sa faible concentration dans ce type d'effluent mais lui-même constitue un véritable risque en termes de rejets industriels. L'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA) l'a classé dans le groupe « A » (cancérogène pour l'homme) (Elahi et al., 2020).

## ***Matériel et méthodes***

### **1. Préparation des solutions mères des métaux lourds**

Les solutions mères des métaux lourds ont été préparées à des concentrations de : 50 g/L, 30g/L, 5 g/L et 4 g/L respectivement pour le Cu, le Ni, le Cr(VI) et l'Ag, en utilisant les formes chimiques suivantes : Cu(SO<sub>4</sub>), Ni(Cl)<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> et Ag<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>), puis elles ont été stérilisées séparément par filtration à travers un filtre de nitrocellulose de 0,2 µm dans des flacons stériles.

### **2. Détermination des CMI des métaux lourds Cu, Ni, Ag et le Cr des isolats étudiés**

La détermination de la CMI des quatre métaux (Cu, Ni, Ag et le Cr) pour les différents isolats a été réalisée sur milieu solide (LB ou YPG). Chaque métal a été testé séparément.

Selon la concentration désirée du métal, des volumes bien précis des solutions mères stériles des métaux ont été additionnés aux milieux de culture après autoclavage, puis chaque isolat a étéensemencé sur des boîtes de Petri contenant le milieu de culture et un des métaux (Cu, Ni, Ag ou Cr) à des concentrations croissantes de 25 mg/L à 750 mg/L. Les boîtesensemencées ont été par la suite incubées à 30 °C pour les levures et les champignons et à 37 °C pour les bactéries. Après incubation, la concentration la plus faible du métal qui ne présente pas de croissance correspond à la CMI du métal testé.

## **IV- Traitement d'un effluent synthétique**

Les isolats qui ont les CMI les plus élevées des quatre métaux testés ont été sélectionnés pour évaluer leur capacité et leur efficacité dans le traitement d'un effluent synthétique de dinanderie.

### **1. Préparation de l'effluent synthétique**

La composition chimique de l'effluent synthétique préparé est détaillée dans le tableau 2.

## Matériel et méthodes

**Tableau 2** : Composition chimique de l'effluent synthétique de dinanderie.

Composés chimiques	Quantité en mg/L
AgNO <sub>3</sub>	78,73
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	2,365
CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,1857
CuSO <sub>4</sub>	22,607
FeCl <sub>3</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,0864
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	1,319
NiCl <sub>2</sub>	478,484
KCN	50,05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	57,318
NH <sub>4</sub> Cl	444,886
NaNO <sub>2</sub>	1,117
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> , H <sub>2</sub> O	3750
<b>Solution d'oligo-éléments</b>	<b>2mL.L<sup>-1</sup></b>

La composition chimique de la solution minérale d'oligo-éléments est présentée dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Composition chimique de la solution d'oligo-éléments

Composés chimiques	Quantité en mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,15
KI	0,03
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0,12
Na <sub>2</sub> MOO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,06
Eau distillée	1 L

Les composés chimiques cités dans les tableaux 3 et 4 ont été mélangés avec de l'eau distillée. La solution finale est agitée pendant 24 heures pour avoir une solubilisation totale de tous les éléments.



## ***Matériel et méthodes***

### **2. Essai du traitement biologique de l'effluent synthétique par les isolats sélectionnés (bioaugmentation)**

Avant l'expérience, toutes les pièces de verrerie nécessaires à cette expérience, ont été lavées avec HNO<sub>3</sub> (30%) pendant 24 h, puis rincées à l'eau distillée, afin d'éliminer tous les contaminants fixés sur la verrerie (Imron et al., 2021).

Après avoir préparé des suspensions microbiennes fraîches des isolats sélectionnés (B9, B7, B2, B5, B3, L1 et C1), 6 mL de chaque suspension microbienne a été ajouté indépendamment sur un volume de 94 mL de l'effluent synthétique dans des Erlen de 250 mL pour avoir un volume utile de 100 mL. L'effluent synthétique a été également inoculé par un consortium de cinq bactéries (B9, B7, B2, B5, B3). Ensuite, tous les Erlen ont été incubés à 37 °C sous agitation de 120 rpm. Un témoin négatif (non inoculé) a été préparé et incubé dans les mêmes conditions pour mettre en évidence l'effet de nos isolats.

Des prélèvements ont été effectués après 48 h et après 7 jours d'incubation pour doser les quatre métaux (Cu, Ni, Ag et le Cr) et déterminer par la suite les taux d'abattement de ces métaux par nos isolats. Ces prélèvements ont été centrifugés à 2500 rpm pendant 15min, le culot a été éliminé et le surnageant a été récupéré et acidifié par HCl. Ensuite, les éléments métalliques Cu, Ni, Ag et le Cr ont été analysés par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-AES).

### **3. Traitement de l'effluent synthétique par couplage d'un procédé chimique et un procédé biologique (bioaugmentation)**

Une étape de prétraitement de l'effluent synthétique par coagulation ou électrocoagulation a été effectuée en premier temps, suivie par un traitement biologique par des isolats sélectionnés (bio-augmentation). La combinaison de ces deux procédés a pour but d'éliminer la totalité des polluants et améliorer la performance et l'efficacité de chaque procédé.

#### **3-1 Prétraitement par coagulation-floculation (Méthodes de JAR-TEST)**

##### **3-1-1. Principe de la méthode de JAR-TEST**

La méthode de Jar-test se base sur le principe de la coagulation floculation. Une série de béchers (4) est agitée de la même façon. Les béchers contiennent les mêmes volumes d'échantillons (effluent synthétique de dinanderie) et ils sont soumis à des doses croissantes du coagulant pour en déterminer la dose optimale (figure 3). Les résultats sont appréciés visuellement, par mesure de turbidité, d'absorbance et du volume des boues.

## *Matériel et méthodes*

Ce processus comprend trois phases :

- \* **Agitation rapide** : le coagulant est introduit dans l'échantillon rapidement et uniformément.
- \* **Coagulation** : l'ajout du coagulant dans une dispersion colloïdale provoque une déstabilisation des particules par une diminution des forces qui tendent à séparer les particules. Le coagulant réagit avec les colloïdes à travers un ensemble de réactions chimiques et physico-chimiques, qui conduisent à la diminution des forces répulsives.
- \* **Floculation** : correspond par définition à la formation des flocs qui sont des agrégats particulaires. C'est la deuxième étape de la formation des particules décantables à partir des colloïdes déstabilisés. Ceci est dû à une agitation lente, qui transforme les particules en flocons de plus grande taille pour permettre la séparation par décantation.



**Figure 3** : Appareillage de jar-test

### **3-1-2. Techniques expérimentales**

Avant de procéder au traitement de l'effluent synthétique étudié, le pH initial et la turbidité de l'effluent ont été mesurés. Cet effluent a un pH de l'ordre de 7 et une turbidité de l'ordre de 220 NTU.

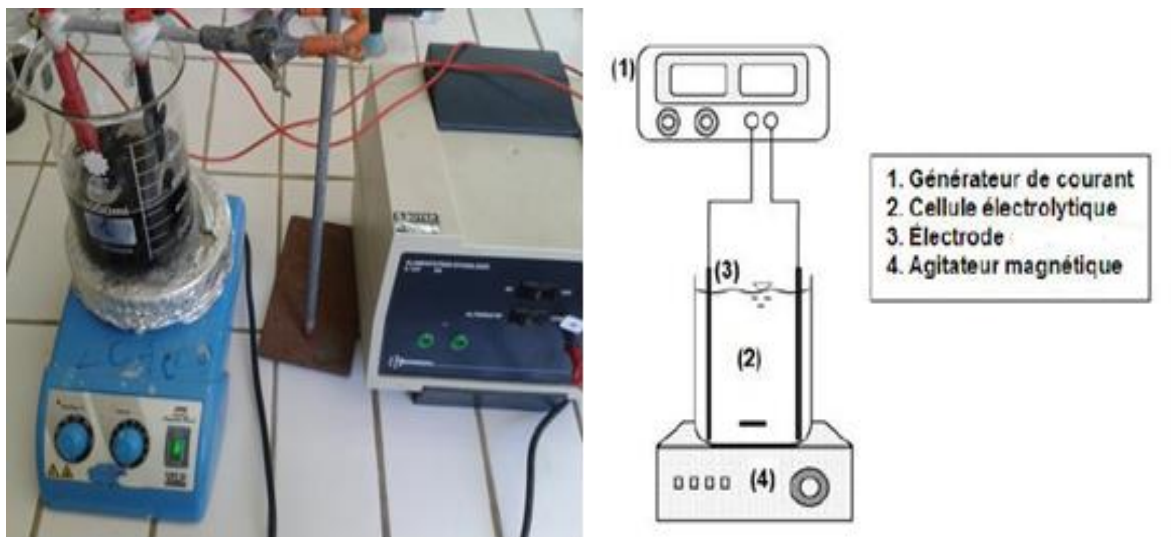
Un volume de 400 ml de l'effluent étudié a été introduit dans une série de 4 béchers de 1L, puis des doses croissantes du coagulant (sulfate d'aluminium) ont été ajoutées. Le mélange a été laissé sous agitation rapide pendant 5 minutes (200 tr/min) puis sous agitation lente (45 tr/min) pendant 20 minutes. Par la suite, la solution a été transvasée dans une éprouvette graduée et laissée pour se décanter.

## *Matériel et méthodes*

Après des temps de décantation bien précis (1 h et 2 h), des volumes  $v$  en ml des surnageants ont été prélevés pour mesurer leur turbidité. Les volumes de boue décantés ont été également mesurés en fonction du temps de décantation. L'efficacité du traitement pour chaque dose de coagulant a été déterminé selon l'abattement de la turbidité et le volumes de boue engendré.

### **3-2 Prétraitement par électrocoagulation**

Un autre échantillon de l'effluent synthétique a été prétraité par électrocoagulation, en utilisant un générateur du courant électrique et des électrodes d'aluminium. La cellule d'électrocoagulation (Figure 4), comporte un volume de 400 ml de l'effluent synthétique préparé et deux électrodes, l'une servant de cathode et l'autre d'anode. Un courant continu de 6 ou 12 V est appliqué aux électrodes par un générateur du courant électrique et l'agitation de la solution dans la cellule électrolytique est assuré par un agitateur magnétique. Après traitement, la solution est laissée pendant 2h pour se décanter.



**Figure 4** : Cellule d'électrocoagulation

Le surnageant de l'effluent synthétique prétraité par coagulation ainsi que celui issu d'électrocoagulation ont été prélevés pour les traiter une deuxième fois, cette fois-ci par les isolats microbiens sélectionnés (bioaugmentation) selon le protocole détaillé dans la partie précédent (traitement biologique de l'effluent synthétique).

# **V-Evaluation du potentiel de production de biofloculants par des isolats microbiens**

## **1- Production des Substances polymériques extracellulaires (EPS)**

La production des EPS par les microorganismes étudiés B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 L1, L2, L3, C1, F1 et F2 ( F1 et F2 ont été isolés de la lagune Bujaraloz-Saragosse de l'Espagne) a été évaluée dans le milieu solide RCV-Saccharose de la composition suivante : 30 g/L de saccharose, 0,1 g/L Extrait de levure et 15 g/L d'agar (Kaci et al., 2005).

Le milieu RCV-saccharose a étéensemencé par stries par les microorganismes étudiés, puis les boîtes inoculées ont été incubées à 37 °C pendant 24 h.

Après incubation, l'apparition d'une substance visqueuse qui ressemble à un gel autour de la colonie indique une production des EPS.

## **2- Production des biofloculants**

Dans cette étude, deux substrats ont été testés pour la production des biofloculants : le marc du café et les déchets du bois.

Le marc du café renferme en moyenne 45.3% des glucides, 9.3 à 16.2% des lipides, 14% des protéines et 6800mg/kg des minéraux (potassium, magnésium, phosphore, calcium, fer, manganèse et cuivre) (Limousy et al., 2013),

Les débris du bois contiennent en moyenne 49 à 53 % de carbone, 40 à 44 % d'oxygène, 6 à 7 % d'hydrogène, 0.2 à 0.5% d'azote et moins de 1% de matières minérales (Hazard et al., 2000).

### **2-1- Evaluation de l'activité floculante des isolats**

L'évaluation de l'activité floculante de nos isolats a été effectuée selon le protocole décrit par Liu et al. (2016) avec quelques modifications.

Les isolats ont étéensemencés dans des Erlenmeyer de 100 mL contenant 25 mL du milieu liquide FSS dont la composition est la suivante : 0,5 g/L de glucose, 0,5 g/L d'amidon, 0,5 g/L d'extrait de levure, 0,5 g/L de peptone, 0,5 g/L de caséine, 0,3 g/L de  $K_2HPO_4$  et 0,05 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Le pH initial du milieu FSS a été ajusté à l'aide d'une solution de  $Na_2CO_3$  (10%) et d'HCl (0,1 M) pour avoir un pH initial de 7 pour la croissance des bactéries

## ***Matériel et méthodes***

et un pH initial de 4 pour la croissance des levures et des champignons. Les milieux ensemencés ont été incubés à 30 °C sous agitation de 120 rpm.

Le taux de floculation de chaque bouillon de culture a été déterminé après 24 h et après 48 h d'incubation selon le protocole suivant : une suspension de 5 g/L d'argile de kaolin a été préparée, puis 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (1%) et 100 µL de la suspension microbienne ont été ajoutés à la suspension d'argile préparée, par la suite le tout a été agité pendant 2 min. Après une minute de décantation, l'absorbance du surnageant a été mesurée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550 nm. Un témoin négatif (sans ajout de culture microbienne) a été préparé de la même manière

Le taux de floculation a été calculé selon l'équation suivante :

$$FA = [A - B] / A \times 100 \%$$

FA : L'activité de floculation.

B : L'absorbance de l'échantillon en présence d'une culture microbienne.

A : L'absorbance du témoin.

Les isolats ayant une activité floculante élevée ont été sélectionnés pour la production et l'extraction des biofloculants.

### **2-2- Production et extraction des biofloculants**

Le protocole de production et d'extraction des biofloculants a été réalisé selon le protocole détaillé par Liu et al. (2016) avec quelques modifications.

40 g du substrat (marc du café ou déchets du bois) ont été mélangés avec 1 litre d'eau distillée. La solution a été laissée sous agitation pendant 24 h, puis 3 g/L d'extrait de levure, 0,6 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,1 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ont été ajoutés à la solution du substrat en agitant le tout pendant quelques minutes.

Les isolats qui ont donné un taux élevé de floculation ont été ensemencés indépendamment dans 50 mL du milieu liquide FSS et incubés sous agitation (120 rpm) à 30 °C pendant une nuit.

Après incubation, 1 mL de chaque culture a été ajouté séparément à 25 mL de la solution préparée du substrat. Ensuite, le tous ont été incubé à 30 °C et sous agitation de 120 rpm pendant 24 h.

Après 24 h d'incubation, les bouillons de fermentation ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 20 min. Le culot a été éliminé pour enlever les cellules et le surnageant a été récupéré

## ***Matériel et méthodes***

et additionné de deux volumes d'éthanol absolu froid, puis centrifugé une deuxième fois à 5000 rpm pendant 20 min pour précipiter le biofloculant. Le précipité résultant a été lavé par l'éthanol 75 %.

### **VI- Conservation des isolats**

La conservation à long terme a été réalisée dans le glycérol selon le protocole suivant : 700µL de culture microbienne a été ajouté sur 300 µL de glycérol stérile dans des Eppendorf stériles puis agités et par la suite conservés à -20 °C.

## **Partie III : Résultats et discussion**

### **I- Caractéristiques de l'effluent de dinanderie**

#### **1. Caractéristiques physicochimiques**

Les résultats des analyses physicochimiques de l'effluent de dinanderie en comparaison avec les valeurs limites des normes marocaines de rejets sont représentés dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Caractéristiques physicochimiques de l'effluent étudié comparées avec les normes Marocaines de rejets (Lois Marocaines relatives à l'environnement, 2010).

<b>Paramètres physicochimiques</b>	<b>Valeurs obtenues</b>	<b>Normes de rejet Marocaine</b>
<b>Température °C</b>	27,7	30
<b>pH</b>	7,88	5,5-9,5
<b>Conductivité électrique (µs/cm)</b>	<b>4100</b>	<b>2700</b>
<b>MES (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>609,5</b>	<b>100</b>
<b>DCO (mg d'O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>1073,55</b>	<b>500</b>
<b>DBO<sub>5</sub> (mg d'O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	15	100
<b>NO<sup>3-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,78	-
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	540,58	-
<b>NH<sup>4+</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<0,1	-
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,96	15

Les résultats rapportés dans le tableau 4 montrent des valeurs élevées de MES (609,5 mg L<sup>-1</sup>), de DCO (1073,55 mg d'O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) et de la conductivité électrique (4100 µs/cm). Ces valeurs dépassent largement les valeurs limites fixées par la réglementation Marocaine en termes de rejets en vigueur (Lois Marocaines relatives à l'environnement, 2010). Toutefois, ces valeurs sont inférieures à celles trouvées par Laidi et al. (2015) qui sont de l'ordre de 6702,35 µs/cm pour la conductivité électrique, 796,8 mg/L de la MES et 3999,35 mg d'O<sub>2</sub>/l de la DCO. Ce qui montre la variabilité de composition des effluents des dinanderies qui dépendrait de l'activité de l'industrie.

## ***Résultats et discussion***

La valeur importante de la conductivité électrique indique une forte minéralisation qui proviendrait de l'emploi excessif des sels (phosphate disodique, sel de cuivre...) au cours du traitement des pièces métalliques (EL Fellah Idrissi, 2002).

La forte charge des matières en suspension est due à l'ensemble des particules organiques et inorganiques contenues dans cet effluent. En effet, cette charge importante des MES change les caractéristiques physicochimiques de l'eau notamment la couleur et la turbidité (Gnagne et al., 2015). De plus, elle limite la pénétration de la lumière dans le milieu aquatique provoquant une diminution de la photosynthèse des phytoplanctons et par conséquent la diminution de l'oxygène dissous, ce qui provoquerait la mort de la flore et de la faune aquatique par asphyxie (Dongo et al., 2013).

La valeur élevée de la DCO indique la présence de grandes quantités de produits chimiques. Elle est due à l'apport excessive des additifs chimiques (carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), hydroxyde de sodium (NaOH), Chlorure de nickel ( $\text{NiCl}_2$ ), cyanure de potassium (KCN) ...) dans les bassins durant les étapes de traitement des pièces métalliques (Laidi et al., 2015).

Le rapport DCO/DBO5 est utilisé pour évaluer et estimer la biodégradabilité d'un effluent donné (Rodier et al., 1996) :

**Si  $\text{DCO/DBO5} < 2$  :** l'effluent est considéré facilement biodégradable.

**Si  $2 < \text{DCO/DBO5} < 3$  :** l'effluent est biodégradable avec des souches sélectionnées.

**Et si  $\text{DCO/DBO5} > 3$  :** l'effluent est considéré difficilement biodégradable.

Le rapport DCO/DBO5 de l'effluent de dinanderie étudié est de l'ordre de 71,57. Cet effluent est donc considéré comme difficilement biodégradable.

### **2. Teneurs en métaux lourds**

La quantification des métaux lourds par ICP a montré des concentrations élevées d'argent, du cuivre et du nickel qui sont, respectivement de l'ordre de 116,57 mg/L, 50,306 mg/L et 30,621 mg/L (tableau 5). Ces valeurs sont quasiment au-delà des normes recommandées par la réglementation Marocaine en termes de rejets en vigueur (Lois Marocaines relatives à l'environnement, 2010). Ces résultats concordent avec ceux trouvés par laïdi et al. (2015) et qui sont de l'ordre de 3,05 mg/L, 10,64 mg/L et 151 mg/L respectivement pour l'argent, le cuivre et le nickel. En effet, ces concentrations élevées de ces éléments résulteraient de l'utilisation de chlorure de nickel, de cyanure d'argent, de sulfate de nickel et des sels de cuivre, lors des étapes du cuivrage, du nickelage et d'argenture (Laidi et al., 2015).



## ***Résultats et discussion***

Ces métaux présentent un risque majeur pour l'être humain et pour l'environnement récepteur.

**Tableau 5** : Teneurs en métaux lourds de l'effluent de dinanderie comparées avec les normes Marocaines de rejets (Lois Marocaines relatives à l'environnement, 2010).

<b>Métaux lourds</b>	<b>Valeurs obtenues (mg/L)</b>	<b>Normes Marocaine de rejet (mg/L)</b>
<b>Argent</b>	<b>116,57</b>	<b>0,1</b>
<b>Cadmium</b>	<0,01	0,25
<b>Cobalt</b>	<0,01	0,5
<b>Chrome total</b>	<0,01	2
<b>Cuivre total</b>	<b>50,306</b>	<b>2</b>
<b>Fer</b>	<0,01	-
<b>Nickel</b>	<b>30,621</b>	5
<b>Plomb total</b>	0,062	1
<b>Zinc</b>	0,07	1

## **II- Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats microbiens**

### **1. Caractéristiques macroscopiques**

Les caractéristiques macroscopiques des différents isolats microbiens étudiés sont représentées dans le tableau 6.

## Résultats et discussion

**Tableau 6** : Caractéristiques macroscopiques des colonies microbiennes des isolats étudiés.

Isolat	Couleur	Taille	Conteur	Aspect	Elévation	Bord	Forme	Opacité
<b>Bactéries</b>								
B1	Blanchâtre	Punctiforme	Régulier	Lisse	Convexe	Entier	Ronde	Transparente
B2	Blanchâtre	Non punctiforme	Irrégulier	Lisse	Plate	Crénelé	Irrégulière	Opaque
B3	Blanchâtre	Non punctiforme	Irrégulier	Rugueux	Plate	Crénelé	Irrégulière	Opaque
B4	Blanchâtre	Punctiforme	Régulier	Lisse	Convexe	Entier	Ronde	Transparente
B5	Blanchâtre	Non punctiforme	Irrégulier	Arborescent	Plissée	Arborescent	Irrégulière	Opaque
B6	Blanchâtre	Punctiforme	Régulier	Lisse	Convexe	Entier	Ronde	Transparente
B7	Blanchâtre	Non punctiforme	Irrégulier	Arborescent	Plissée	Arborescent	Irrégulière	Opaque
B8	Blanchâtre	Punctiforme	Régulier	Lisse	Convexe	Entier	Ronde	Transparente
B9	Blanchâtre	Non punctiforme	Régulier	Lisse	Convexe	Entier	Ronde	Transparente
<b>Champignon</b>								
C1	Gris	Non punctiforme	Irrégulier	Cotonneux	Convexe	Crénelé	Irrégulière	Opaque
<b>Levures</b>								
L1	Blanchâtre	Non punctiforme	Régulier	Lisse	Plate	Entier	Ronde	Opaque
L2	Blanchâtre	Non punctiforme	Régulier	Lisse	Convexe	Entier	Ronde	Transparente
L3	Blanchâtre	Non punctiforme	Régulier	Lisse	Convexe	Entier	Ronde	Opaque

## 2. Caractéristiques microscopiques

La coloration de Gram et l'observation microscopique des cellules bactériennes nous a permis de déterminer le type de Gram et la forme des cellules. L'ensemble des résultats obtenus sont représentés dans le tableau 7.

## *Résultats et discussion*

**Tableau 7** : Caractéristiques microscopiques des bactéries étudiées.

<b>Isolats</b>	<b>Forme</b>	<b>Type de Gram</b>
<b>B1</b>	Bacille	Gram positif
<b>B2</b>	Bacille en chaînette sporulé	Gram positif
<b>B3</b>	Bacille en chaînette sporulé	Gram positif
<b>B4</b>	Bacille en chaînette	Gram positif
<b>B5</b>	Bacille en chaînette sporulé	Gram positif
<b>B6</b>	Cocci en chaînette	Gram positif
<b>B7</b>	Bacille sporulé	Gram positif
<b>B8</b>	Cocci	Gram positif
<b>B9</b>	Bacille en chaînette	Gram positif

### **III- Evaluation de la résistance des isolats étudiés vis-à-vis les éléments métalliques Cu, Ni, Ag et le Cr**

Les résultats rapportés dans le tableau 8 montrent les seuils de résistance de chaque isolat vis-à-vis les quatre métaux testés et leur aspect morphologique en présence de ces éléments métalliques.

Plus la CMI est élevée, plus l'isolat est résistant et inversement, plus la CMI est faible, plus l'isolat est sensible au métal testé.

## Résultats et discussion

**Tableau 8 :** CMI des isolats étudiés pour les quatre métaux testés et leur aspect morphologique en présence de ces éléments métalliques.

Isolat	CMI (mg/L)				Aspect des colonies			
	Cu	Cr	Ni	Ag	Cu	Cr	Ni	Ag
<b>Bactéries</b>								
<b>B1</b>	350	100	200	50	Colonies de couleur marron clair	Aspect normal	Colonies de couleur rouge brique à marron foncé	Aspect normal
<b>B2</b>	350	250	200	<b>350</b>	Colonies de petite taille et de couleur marron clair	Colonies de petite taille	Aspect normal	Colonies de petite taille et de couleur marron
<b>B3</b>	350	350	200	100	Colonies de couleur marron clair	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal
<b>B4</b>	350	150	200	50	Colonies de couleur marron clair	Aspect normal	Colonies de couleur rouge brique à marron foncé	Aspect normal
<b>B5</b>	300	250	200	50	Aspect normal	Aspect normal	Colonies entourées par une substance muqueuse	Aspect normal
<b>B6</b>	300	150	<b>750</b>	200	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal	Colonies de couleur marron
<b>B7</b>	300	300	200	100	Colonies muqueuses	Colonies de très petites taille	Colonies muqueuses	Aspect normal
<b>B8</b>	200	300	100	100	Aspect normal	Colonies de couleur foncée	Aspect normal	Aspect normal
<b>B9</b>	350	300	200	150	Colonies de couleur marron clair	Aspect normal	Aspect normal	Colonies de couleur marron
<b>Levures</b>								
<b>L1</b>	200	300	150	50	Colonies de petite taille	Colonies de petite taille et leur centre est de couleur marron	Aspect normal	Aspect normal
<b>L2</b>	200	50	150	50	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal
<b>L3</b>	200	50	150	50	Colonies de couleur marron	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal
<b>Champignon</b>								
<b>C1</b>	<b>750</b>	<b>450</b>	150	300	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal

## ***Résultats et discussion***

Les résultats obtenus montrent une multi-résistance des isolats étudiés vis-à-vis des quatre éléments métalliques testés avec des degrés de tolérance élevés et variables d'un métal à l'autre :

Pour le cuivre, l'isolat qui se montre plus résistant à ce métal est le champignon C1 qui a une CMI très élevée de l'ordre de 750 mg/L, alors que la CMI la plus faible qui est de l'ordre de 200 mg/L a été enregistrée chez les trois levures (L1, L2 et L3) et chez la bactérie B8.

La CMI la plus élevée du chrome hexavalent qui a été obtenue est de l'ordre de 450 mg/L, chez le champignon C1. Tandis que, la plus faible CMI de ce métal est de l'ordre de 50 mg/L chez les deux levures L2 et L3.

Pour l'argent, la CMI la plus importante qui a été enregistrée est de l'ordre de 350 mg/L chez la bactérie B2 et la plus faible CMI notée est de l'ordre de 50 mg/L.

Concernant le nickel, la bactérie B6 a montré un degré très élevé de tolérance envers ce métal, avec une CMI de l'ordre de 750 mg/L. Le nickel est un oligo-élément essentiel mais à de très faibles concentrations de l'ordre de nanomolaire. Il est essentiel pour l'activité de certaines enzymes à savoir, les hydrogénases, les CO déshydrogénases, les uréases et un type particulier de superoxyde dismutase. Cependant, à des fortes concentrations, ce métal entraîne des dommages intracellulaires notamment au niveau des protéines, comme il peut interférer avec les acides nucléiques (Haferburg et Kothe, 2007).

La résistance de ces isolats à ces éléments métalliques serait due à leur adaptation aux conditions environnementales de stress métallique du biotope dans lequel ils ont vécu (des sites contaminés par les ions métalliques). En effet, plusieurs études ont montré des degrés élevés de résistance aux métaux lourds chez des microorganismes isolés à partir des zones polluées par les métaux lourds (Kim et al., 2015; Nayak et al., 2018).

Selon les résultats obtenus, on remarque que le champignon étudié (C1) à un degré très élevé de résistance vis-à-vis des métaux lourds testés. En effet, les champignons sont bien connus par leur capacité à tolérer et à détoxifier les effluents contaminés par les métaux lourds (Jaya et al., 2018). Plusieurs espèces fongiques ont montré leur capacité à absorber les métaux lourds Hg, Pb, Cd, Cu, et Zn dans leur mycélium et dans leurs spores (Rajkumar et al., 2012). D'ailleurs, une étude menée par Congeevaram et al. (2007) a montré que les champignons du genre *Micrococcus* et *Aspergillus* tolèrent des concentrations très élevées du chrome et du nickel. De plus, une autre étude a signalé que plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ont une très bonne capacité de biosorption des éléments métalliques et plusieurs espèces fongiques du

## ***Résultats et discussion***

genre *Rhizopus* ont de bonnes propriétés de séquestration des ions métalliques (Wang et Chen, 2009).

Selon Jaya et al. (2018), les principaux mécanismes impliqués dans la détoxification des éléments métalliques par les champignons sont : la précipitations extracellulaire et intracellulaire, la biotransformation, la biosorption et la bioaccumulation.

Il faut noter que, contrairement aux polluants organiques, les microorganismes ne peuvent pas dégrader les métaux lourds, mais ils peuvent modifier leur état de valence pour les convertir a des formes stables moins toxiques (Chaturvedi et al., 2015).

Les résultats montrent également que l'aspect morphologique des colonies varie en fonction du métal testé. Ceci peut être expliqué par la différence des mécanismes de résistance adoptés par ces isolats vis-à-vis les ions métalliques, afin de protéger leurs composants intracellulaires et extracellulaires et leur homéostasie cellulaire.

Ianeva. (2009) a signalé que les principaux mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds sont : la séquestration extracellulaire et intracellulaire, l'extrusion (les ions métalliques sont poussés hors de la cellule) et les barrières extracellulaires qui empêchent la pénétration de ces métaux dans la surface cellulaire, et qui sont principalement, la paroi cellulaire, la membrane plasmique, la capsule et aussi les EPS. Ces dernières se trouvent sur la surface la plus externe de plusieurs bactéries. La structure de ces EPS permet la séquestration des éléments métalliques et les empêchent de pénétrer dans la cellule.

Notre étude a révélé que les deux Bactéries B5 et B7 produisent des quantités énormes des EPS en présence du cuivre ou du nickel (les colonies deviennent muqueuses). D'ailleurs, Banerjee et al. (2020) ont rapporté également que la souche *Pseudomonas sp PFAB4* produit des EPS sous induction des ions Ag. En effet, les bactéries surproduisent les EPS en réponse à un stress environnemental. Ces EPS contiennent plusieurs groupes fonctionnels tels que les groupes carboxyle, phosphorique, amine et hydroxyle, qui sont chargés négativement (à pH neutre) et qui sont capables de former des complexes organométalliques avec les cations métalliques (Gutnick et Bach, 2000). En général, les EPS sont produits par les microorganismes pour se protéger et survivre dans des conditions environnementales défavorables (Gupta et Diwan, 2017; Hussein et al., 2019).

Les levures étudiées (L1, L2, L3) ont également un degré important de résistance vis-à-vis des ions métalliques testés. Plusieurs études ont montré l'utilisation des levures dans la bioremédiation des environnements contaminés par les métaux lourds. Elles ont été utilisées

## ***Résultats et discussion***

comme biosorbants pour éliminer une large gamme d'éléments métalliques à savoir : Zn, Cr, Au, Cu, Cd, Co, Th, Pb, Ni, U et Ag. Les levures du genre, *Candida*, *Pichia* et *Saccharomyces* sont parmi les levures qui ont montré une efficacité importante dans la biosorption des ions métalliques (Wang et Chen, 2009 ; Bahafid et al., 2013).

Les mécanismes de résistance bactérienne sont codés généralement par des gènes plasmidiques ou chromosomiques ou par des transposons, et c'est rarement que les bactéries acquièrent leur résistance aux ions métalliques par des mutations spontanées (Bruins et al., 2000 ; Nies et Silver, 1995). De plus , les gènes bactériens et fongiques qui codent pour ces systèmes de résistance ont commencé à être identifiés et clonés pour préparer des micro-organismes génétiquement modifiés dans le but d'améliorer l'efficacité d'élimination des métaux lourds dans les environnements contaminés (Chaturvedi et al., 2015). D'ailleurs, La modification génétique a été effectuée sur diverses bactéries et champignons pour l'élimination des éléments métalliques de l'environnement aquatique (Deng et al., 2003 ; Kostal et al., 2004 ; Sriprang et al., 2003).

Finalement, ces résultats montrent que ces isolats pourraient être des bons candidats pour le traitement des sites pollués par ces métaux lourds.

## **IV- Traitement d'un effluent synthétique de dinanderie**

### **1- Traitement biologique de l'effluent synthétique par les isolats sélectionnés (bio-augmentation)**

L'effluent synthétique de dinanderie a été traité séparément par les isolats B2, B3, B5, B7 B9, un consortium de ces cinq bactéries, L1 et C1. Les taux d'abattement des quatre métaux lourds (Ag, Cu, Cr, Ni) par les isolats étudiés après 48h sont intéressants mais nous avons choisi de présenter juste les résultats d'abattement de ces métaux après 7 jours d'incubation (tableau9).

Les résultats obtenus montrent que la bactérie B5 a donné l'abattement le plus élevé d'argent (40.32%). Pour le cuivre et le chrome, le meilleur abattement qui a été enregistré est de l'ordre de 62.08% pour le cuivre et 73.74% pour le chrome chez la levure L1, alors que pour le nickel, les taux d'abattement enregistrés sont faibles chez tous les isolats étudiés. Cette variation des taux d'abattement de ces métaux d'un isolat à autre et d'un métal à autre peut être due à la forme ionique de chaque métal et à la capacité de chaque microorganisme à l'accumuler, l'adsorber et ou le transformer. En effet, l'abattement de ces éléments métalliques est dû aux différents

## Résultats et discussion

mécanismes adoptés par ces microorganismes notamment la bioaccumulation et la biosorption (Laidi et al., 2015). Plusieurs études ont montré l'utilisation des bactéries, des levures et des champignons dans la biosorption des métaux lourds. A titre d'exemple, la bactérie *Bacillus licheniformis* isolée de la province du Hunan en Chine, a été utilisée pour piéger le Chrome hexavalent à partir des solutions aqueuses (Jacques et al., 2007). Ainsi, Bahafid et al. (2013) ont signalé la capacité de trois espèces de levures : *Cyberlindnera fabianii*, *Wickerhamomyces anomalus* et *Candida tropicalis* dans la biosorption du Cr(VI).

Le taux d'abattement d'argent, du chrome et du cuivre par le consortium sont plus faibles que ceux obtenus par chaque isolat seule. Ceci pourrait être expliqué par l'antagonisme entre les cinq bactéries du consortium.

**Tableau 9 :** Taux d'abattement des métaux lourds Ag, Cu, Cr et Ni par les isolats étudiés après 7jours d'incubation.

Traitement	Taux d'abattement (%)			
	Ag	Cr	Cu	Ni
<b>B2</b>	38,50	48,25	53,01	<b>17,74</b>
<b>B3</b>	36,29	52,71	36,15	15,66
<b>B5</b>	<b>40,32</b>	34,25	44,82	13,71
<b>B7</b>	28,75	36,42	42,69	14,41
<b>B9</b>	29,40	58,38	44,08	12,36
<b>Consortium bactérien</b>	28,23	29,22	43,41	12,44
<b>L1</b>	36,28	<b>73,74</b>	<b>62,08</b>	11,50
<b>C1</b>	36,23	68,61	60,89	9,13

## 2- Traitement de l'effluent synthétique par couplage d'un procédé chimique et un procédé biologique (bio-augmentation)

### 2-1 Prétraitement par coagulation-floculation

Les résultats des essais de coagulation-floculation par le sulfate d'aluminium (coagulant) sont illustrés sur le tableau 10.



## Résultats et discussion

**Tableau 10 :** Essais d'optimisation de la coagulation-floculation par le sulfate d'aluminium.

Essai	Quantité du coagulant (mg)	Turbidité après 1h de décantation (NTU)	Turbidité après 2h de décantation (NTU)	Volume des boues après 2h de décantation (ml)
1	40	28	15	10
2	60	16	10	13
<b>3</b>	<b>80</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>15</b>
4	100	18	11	12

Les résultats obtenus montrent que l'abattement de la turbidité après 2 heures de décantation est de l'ordre de 93,18%, 95,45%, 98,18% et 95% respectivement pour 40 mg, 60 mg, 80 mg et 100 mg du sulfate d'aluminium. D'après ces résultats, on peut conclure que la dose optimale du coagulant (sulfate d'aluminium) est 80 mg, elle donne le meilleur abattement de la turbidité (98,18 %) et un volume important de boues (15 mL).

### 2-2 Prétraitement par électrocoagulation

Les résultats des essais d'électrocoagulation par des plaques d'aluminium sont représentés dans le tableau 11.

**Tableau 11 :** Essais d'électrocoagulation par des plaques d'aluminium.

Temps d'électrolyse (mn)	5	15	30
Turbidité après 2 h de décantation (NTU)	11	32	49

Les résultats obtenus montrent que l'électrolyse par des plaques d'aluminium pendant 5 min et après 2 heures de décantation a permis une meilleure diminution de la turbidité (95%). Alors qu'une durée d'électrolyse de 15 min ne diminue la turbidité initiale de l'effluent synthétique étudié (220 NTU) que de 85,45% et pour 30 min d'électrolyse, l'abattement de la turbidité n'est que de 78,63%.

## ***Résultats et discussion***

Après avoir traité l'effluent synthétique par un des procédés chimiques (coagulation ou électrocoagulation), le surnageant issu de ce premier traitement a été traité par des isolats microbiens. Les taux d'abattement des métaux lourds par coagulation, par électrocoagulation et par couplage d'un procédé chimique (coagulation ou électrocoagulation) et un procédé biologique (bio-augmentation par des isolats microbiens pendant 7 jours) sont représentés dans le tableau 12.

**Tableau 12 :** Taux d'abattement des métaux lourds Ag, Cu, Cr et Ni par différents traitements

<b>Traitement</b>	<b>Taux d'abattement (%)</b>			
	<b>Ag</b>	<b>Cr</b>	<b>Cu</b>	<b>Ni</b>
<b>Coagulation</b>	11,09	>96,66	90,42	51,85
<b>Coagulation + B2</b>	27,37	>96,66	91,77	51,85
<b>Coagulation + B7</b>	24	>96,66	94,21	51,85
<b>Coagulation + C1</b>	39,47	>96,66	93,63	51,85
<b>Coagulation + L1</b>	16,40	>96,66	90,43	52,81
<b>Electrocoagulation</b>	13,58	>96,66	86,41	82,88
<b>Electrocoagulation + B2</b>	15,13	>96,66	91,92	82,91
<b>Electrocoagulation + L1</b>	18,83	>96,66	90,53	83

Les résultats obtenus montrent que les taux d'abattement d'argent par coagulation et par électrocoagulation sont inférieurs à ceux obtenus par les isolats seules par bioaugmentation (tableau 9). Ce qui montre que nos isolats sont plus efficaces que les deux procédés chimiques (coagulation et électrocoagulation) dans l'élimination d'argent. Alors que pour le chrome, le cuivre et le nickel la coagulation et l'électrocoagulation ont montré des abattements très supérieurs à ceux trouvés par le procédé biologique (tableau 9).

Les résultats montrent également que les taux d'abattement par couplage des deux procédés biologique et chimique ont augmenté légèrement par rapport aux abattements par procédés chimiques seules.

## Résultats et discussion

### V-Evaluation du potentiel de production de biofloculants par les isolats étudiés

#### 1. Production des Substances polymériques extracellulaires (EPS)

La production des EPS par les microorganismes étudiés a été évaluée sur milieu solide RCV-Saccharose. L'ensemble des résultats obtenus sont représentés dans le tableau 13.

**Tableau 13 :** Potentiel de production des EPS par les isolats microbiens étudiés

Isolat	Production des EPS
<b>Bactéries</b>	
B1	+
B2	++
B3	+++
B4	+
B5	++
B6	++
B7	+++
B8	++
B9	++
F1	+++
F2	+++
<b>Levures</b>	
L1	+++
L2	+
L3	++
<b>Champignon</b>	
C1	+++
+++ production importante	
++ production moyenne	
+ production faible	

## ***Résultats et discussion***

Les résultats obtenus montrent une production importante des EPS chez les bactéries B3, B7, F1, F2, chez la levure L1 et chez le champignon C1. Ainsi, une production moyenne de ces biopolymères a été observée chez les bactéries B2, B5, B6, B8, B9 et chez la levure L3. De plus, une production relativement faible a été signalée chez les deux bactéries B1 et B4 et chez la levure L2. En effet, plusieurs études ont été intéressées par l'isolement des microorganismes productrices des EPS. Par exemple, Nanjani et Soni. (2012) ont isolé 23 bactéries qui produisent 0,2 à 10,60 g/L des EPS à partir des échantillons de sol de Veraval et Dwarka.

Les EPS sont des biopolymères composés d'une grande variété de macromolécules de haut poids moléculaire à savoir les polysaccharides (75 à 90 % de la masse), les protéines, les acides nucléiques, les lipides et quelques molécules non-polymériques de faible poids moléculaire (Li et Yu, 2014). Ces biopolymères proviennent du différents processus microbiens à savoir : sécrétion active, libération du matériel cellulaire, lyse cellulaire et adsorption des substances du milieu (Laspidou et Rittmann, 2002). Ils ont plusieurs rôles à savoir : l'adhésion cellulaire, la formation d'agrégats cellulaires (biofilms, boues, biogranules) et la protection contre les agressions du l'environnement extérieur... (Bhaskar et Bhosle, 2006 ; Kenney et Fein, 2011). De plus, ils ont un rôle primordial dans la biosorption des métaux lourds. D'ailleurs plusieurs études ont prouvé que ces EPS ont des bonnes propriétés de rétention des ions métalliques. Par exemple Yue et al. (2015) ont révélé une capacité importante de biosorption du Cu (495 mg/g, Cu/EPS), du Zn (765 mg/g, Zn/EPS), et du Cd (495 mg/g, Cd/EPS) par des EPS sécrétées par des bactéries sulfato-réductrices. Ainsi, Wei et al. (2016) ont également signalé que les EPS produites par des bactéries du genre *Klebsiella* ont montré une capacité de biosorption importante du Pb(II) de l'ordre de 99,5 mg/g (Pb(II)/EPS). En outre, ces EPS ont également un rôle important dans la floculation, elles ont été utilisées comme alternatives des flocculants chimiques. D'ailleurs les EPS produites par plusieurs souches bactériennes ont été examinées pour leur capacité à flocculer des particules de kaolin et de favoriser leur décantation. Bala et al. (2010) ont montré une augmentation significative de la capacité de floculation des particules par des EPS.

Toutes ces études suggèrent que les EPS peuvent être utilisées pour le traitement des eaux usées.

## Résultats et discussion

### 2. Production des biofloculants

#### 2-1 Evaluation de l'activité floculante des isolats étudiés

Les taux de floculation de chaque isolat après 24h et 48h d'incubation sont rapportés dans le tableau 14.

**Tableau 14** : Taux de floculation des isolats étudiés après 24h et 48h d'incubation

Traitement	Taux de floculation après 24h d'incubation (%)	Taux de floculation après 48h d'incubation (%)
<b>Bactéries</b>		
<b>B1</b>	40,35	37,89
<b>B2</b>	23,97	5,78
<b>B3</b>	<b>57,60</b>	11,05
<b>B4</b>	30,11	20
<b>B5</b>	30,99	5,26
<b>B6</b>	<b>67,83</b>	27,89
<b>B7</b>	<b>59,64</b>	18,42
<b>B8</b>	<b>62,57</b>	26,31
<b>B9</b>	<b>54,38</b>	32,63
<b>F1</b>	<b>74,50</b>	30
<b>F2</b>	<b>78,83</b>	25,78
<b>Levures</b>		
<b>L1</b>	<b>50,29</b>	14,21
<b>L2</b>	38,83	28,42
<b>L3</b>	46,54	43,68
<b>Champignon</b>		
<b>C1</b>	<b>56,25</b>	-

Les résultats obtenus montrent des taux de floculation qui dépassent 50%, pour les bactéries B3, B6, B7, B8, B9, F1, F2, pour la levure L1 et pour le champignon C1 après 24h d'incubation. On remarque que les taux de floculation de tous les isolats étudiés diminuent après 48h d'incubation, cela pourrait être due à une dégradation enzymatique partielle du biopolymère

## Résultats et discussion

dans les phases tardives de croissance cellulaire (Choi et al., 1998). En effet, de nombreuses études ont signalé que la production du biofloculant est parallèle à la croissance cellulaire. Les profils de production de biofloculants de *Bacillus agaradhaerens* C9 (Liu et al., 2015), *Serratia ficaria* (Gong et al., 2008), *Bacillus sp F19* (Zheng et al., 2008) et *Proteus mirabilis TJ-1* (Xia et al., 2008) ont montré une bonne corrélation avec la courbe de croissance cellulaire et leur taux de floculation maximal est atteint en phase stationnaire, ce qui indique que ces biofloculants ont été formés par biosynthèse par assimilation des nutriments au cours de la croissance cellulaire, et non par autolyse cellulaire.

### 2-2 Production et Extraction des biofloculants

Les isolats qui ont montré un taux de floculation important qui dépasse 50% ont été sélectionnés pour la production des biofloculants, en utilisant des substrats moins coûteux : les déchets du bois et le marc du café. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 15.

**Tableau15 :** Production des biofloculants par des isolats microbiens en utilisant les déchets du bois et le marc du café comme substrat.

Isolat	Production du biofloculant / marc du café	Production du biofloculant / débris du bois
<b>F1</b>	+++	+
<b>F2</b>	+++	+
<b>B3</b>	+++	+
<b>B6</b>	+	+
<b>B7</b>	+++	+
<b>B8</b>	+	+
<b>B9</b>	++	+
<b>L1</b>	+++	+
<b>C1</b>	+++	+
+++ Quantité importante		+ Quantité faible
++ Quantité moyenne		

## ***Résultats et discussion***

Les résultats obtenus montrent que la production de biofloculants en utilisant les déchets du bois comme substrat, a donné des quantités très faibles de biofloculants chez tous les microorganismes étudiés. Ceci pourrait être expliquée par l'absence des enzymes qui dégradent les polymères des déchets du bois (cellulose, lignine, hémicellulose...) en oligo/monomères assimilables chez ces isolats étudiés (Pennacchio et al., 2018).

En utilisant le marc du café, les isolats F1, F2, B7, B3, C1 et L1 ont montré des quantités importantes de biofloculants extraits. Alors que, pour les deux bactéries B6 et B8 la quantité du biofloculants obtenue était faible.

Il faut noter que la production des biofloculants est influencée par plusieurs facteurs nutritionnels et environnementaux à savoir : la durée d'incubation, le pH initial, la température d'incubation, la source de carbone et d'azote. Il faut donc, optimiser tous ces facteurs pour avoir un rendement important des biofloculants (Gomaa, 2012).

Plusieurs études ont prouvé l'utilisation des déchets agricoles comme source de carbone pour la production des biofloculants. Wang et al. (2013) ont montré la production d'un biofloculant par *Ochrobactrum ciceri* W2 en utilisant l'hydrolysats de tiges du maïs et Guo et al. (2015) ont signalé que *Rhodococcus erythropolis* a pu produire un biofloculant à partir de l'hydrolysats de tiges du riz.

De plus, plusieurs chercheurs ont montré l'efficacité de ces biofloculants dans le traitement des eaux usées (Gomaa, 2012; Gong et al., 2008; W. Liu et al., 2016). A titre d'exemple, Liu et al. (2016) ont utilisé le biofloculant produit par *Pseudomonas veronii* L918 dans le traitement des eaux usées de rinçage des cendres générées par une centrale électrique au charbon. Ce biofloculant a montré un taux de floculation qui dépasse 90%, avec une dose optimale de l'ordre de 2,83 mg/L.

## **Conclusion**

Les dinanderies de la ville de Fès sont considérées comme une source majeure de la pollution de la région de Fès à cause de leurs effluents qui sont fortement chargés en métaux lourds et qui présentent des risques énormes pour l'homme et l'environnement.

La caractérisation physico-chimique d'un effluent de dinanderie a montré des concentrations alarmantes du cuivre (50,306 mg/L), d'argent (116,57 mg/L) et du nickel (30,621 mg/L) ainsi qu'une teneur élevée de la DCO (1073,55 mg d'O<sub>2</sub>/L), de la MES (609,5 mg/L) et de la conductivité électrique (4100 µs/cm). Ce qui nécessite un traitement adéquat pour cet effluent avant d'être rejeté dans la nature. De ce fait, les seuils de résistances des microorganismes qui ont été isolés à partir des zones polluées par les métaux lourds dans le cadre des travaux précédents ont été évalués dans cette étude afin de sélectionner les plus résistants aux quatre métaux testés (Ag, Cu, Cr, Ni). Les isolats qui ont les CMI les plus élevées de ces métaux ont été utilisés dans des essais du traitement d'un effluent synthétique de dinanderie afin d'évaluer leur capacité et leur efficacité dans l'élimination de ces métaux. Le traitement de l'effluent synthétique par ces isolats a montré des taux d'abattelements qui dépassent 50% pour le cuivre et le chrome et des abattements inférieurs à 50% pour l'argent et le nickel. Ces abattements pourraient être améliorés par optimisation des conditions physico-chimiques de chaque isolat. Le Traitement de l'effluent synthétique par couplage d'un procédé chimique (coagulation ou électrocoagulation) et un procédé biologique (bioaugmentation) a montré des abattements très importants de cuivre, de chrome et de nickel qui dépassent largement les abattements obtenus par procédé biologique seul. En conséquence, ces isolats pourraient être utilisés dans des bioréacteurs tel que le SBR où les conditions physico-chimiques sont bien contrôlées afin d'augmenter l'efficacité du traitement de ces effluents de dinanderie.

De plus, les microorganismes ont été également testés pour la production de biofloculants en utilisant les déchets du bois et le marc du café comme substrats. Dans le cas où les déchets du bois étaient utilisés comme substrat, la production des biofloculants par tous les isolats étudiés était très faible alors qu'en utilisant le marc du café, les isolats F1, F2, B7, B3, C1 et L1 ont montré des quantités importantes de biofloculants. Ces biopolymères pourraient être une solution alternative écologique et moins coûteuse que les procédés chimiques classique pour le traitement des eaux usées.



## **Références**

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentasti, E., Sarzanini, C., Barberis, R (2002). Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles. *Environmental Pollution*. 119(2), 177–193.
- Amarasinghe, B.M.W.P.K., Williams, R.A (2007). Tea waste as a low cost adsorbent for the removal of Cu and Pb from wastewater. *Chemical Engineering Journal*. 132(1–3), 299–309.
- Aoudjehane, M., Rezzouk, M., Kellil, A., Aurelle, Y., Guigui, C (2010). Comparative study of electrocoagulation and coagulation-flocculation effects on the destabilization of cutting oil emulsion. *Revue Des Sciences de l'Eau*. 23(1), 17–30.
- Bahafid, W., Tahri Joutey, N., Sayel, H., Iraqui-Houssaini, M., El Ghachtouli, N (2013). Chromium Adsorption By Three Yeast Strains Isolated From Sediments In Morocco. *Geomicrobiology Journal*. 30, 422-429.
- Bala, S., Yan, S., Tyagi, R., Surampalli, R (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge : Isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering. *Water Research*. 44(7), 2253-2266.
- Banerjee, A., Das, D., Rudra, S. G., Mazumder, K., Andler, R., Bandopadhyay, R (2020). Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Pseudomonas* sp. PFAB4 for Synthesis of EPS-Coated AgNPs with Antimicrobial Properties. *Journal of Polymers and the Environment*. 28(1), 242–256.
- Benmoussa, H., Tyagi, R.D., Campbell, P.G.C., Blais, J.F (1994). Lixiviation biologique des métaux lourds et stabilisation des boues municipales. *Water Quality Research Journal*. 29(1), 39–52.
- Bernhardt, E.S., Colman, B.P., Hochella, M.F., Cardinale, B.J., Nisbet, R.M., Richardson, C.J., Yin, L (2010). An Ecological Perspective on Nanomaterial Impacts in the Environment. *Journal of Environmental Quality*. 39(6), 1954–1965.
- Bhaskar, P.V., Bhosle, N.B., (2006). Bacterial extracellular polymeric substances (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food chains. *Environment International*. 32, 191- 198.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45(3), 198–207.
- Chaturvedi, A.D., Pal, D., Penta, S., Kumar, A (2015). Ecotoxic heavy metals transformation by bacteria and fungi in aquatic ecosystem. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(10), 1595–1603.

- Choi, C.W., Yoo, S.A., Oh, I.H., & Park, S.H (1998). Characterization of an extracellular flocculating substance produced by a planktonic cyanobacterium *Anabaena sp.* Biotechnology Letters. 20(7), 643–646.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., (2006). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties Part I : Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. Enzyme and Microbial Technology. 38, 237-245.
- Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., Thamaraiselvi, K (2007). Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. Journal of Hazardous Materials. 146(1-2), 270–277.
- Dąbrowski, A., Hubicki, Z., Podkoscielny, P., Robens, E (2004). Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method. Chemosphere. 56(2), 91–106.
- Deng, X., Li, Q.B., Lu, Y. H., Sun, D.H., Huang, Y.L., Chen, X.R (2003). Bioaccumulation of nickel from aqueous solutions by genetically engineered *Escherichia coli*. Water Res. 37, 2505–2511.
- Deng, X., Yang, Z., & Chen, R (2019). Study of characteristics on metabolism of *penicillium chrysogenum fl* during bioleaching of heavy metals from contaminated soil. Canadian Journal of Microbiology. 65(9), 629–641.
- Dongo, K.R., Niamke, B.F., Adje, A.F., Britton, B.G.H., Nama, L.A., Anoh, K.P., Adima, A.A., Atta, K (2013). Impacts des effluents liquides industriels sur l’environnement urbain d’Abidjan - Côte D’Ivoire. Int. J. Biol. Chem. Sci. 7(1), 404-420.
- Dula, T., Duke, T.N (2019). Removal Methods of Heavy Metals from Laboratory Wastewater. Journal of Natural Sciences Research. 9(2), 36-42.
- EL Fellah Idrissi, B (2002). Evaluation et étude des paramètres physico-chimiques de la pollution générée par les unités industrielles dans la région de Fès. Thèse de doctorat : département géographie. Faculté des lettres et des sciences humaine, Fès-Saïs, 1-116.
- Elahi, A., Arooj, I., Bukhari, D.A., Rehman, A (2020). Successive use of microorganisms to remove chromium from wastewater. Applied Microbiology and Biotechnoloy. 104(9), 3729–3743.
- Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M., Blaghen, M (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Current Microbiology. 41(3), 151–156.

- Fu, F., Wang, Q (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters : A review. *Journal of Environmental Management*. 92(3), 407–418.
- Gadd, G.M (1992). Metals and microorganisms : A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters*. 100(1-3), 197-203.
- Gnagne, Y., Yapo, B., Meite, L., Kouame, V., Gadji, A., Mambo, V., Houenou, P (2015). Caractérisation physico-chimique et bactériologique des eaux usées brutes du réseau d'égout de la ville d'Abidjan. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 9(2), 1082.
- Goff, F., Bonnomet, V (2004). Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM. Rapport technique : Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable Direction de l'Eau. Paris, 85p.
- Gomaa, E.Z (2012). Production and characteristics of a heavy metals removing bioflocculant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Polish Journal of Microbiology*. 61(4), 281–289.
- Gong, W.X., Wang, S.G., Sun, X.F., Liu, X.W., Yue, Q.Y., Gao, B.Y (2008). Bioflocculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment. *Bioresource Technology*. 99(11), 4668–4674.
- Goswami, S., Mazumder, D (2014). Scope of biological treatment for composite tannery wastewater. *International journal of environmental sciences*. 5(3), 607–622.
- Guibaud, G (2003). Relation between extracellular polymers composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere*. 52, 1701-1710.
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S., Baudu, M (2005). Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produces by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere*. 59, 629-638.
- Gunatilake, S.K (2015). Methods of Removing Heavy Metals from Industrial Wastewater. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science Studies*. 1(1), 12-16.
- Guo, J., Yu, J., Xin, X., Zou, C., Cheng, Q., Yang, H., Nengzi, L (2015). Characterization and flocculation mechanism of a bioflocculant from hydrolyzate of rice stover. *Bioresource Technology*. 177, 393–397.
- Gupta, P., Diwan, B (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*. 13,58–71
- Gutnick, D.L., Bach, H (2000). Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. *Applied Microbiology and*

Biotechnology. 54(4), 451–460.

- Haferburg, G., Kothe, E (2007). Microbes and metals : interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology*. 47(6), 453–467.
- Hazard, C., Barette, J.P., Mayer, J (2000). *Mémotech Bois et matériaux associés*. Casteilla. 523.
- Hussein, M.H., Hamouda, R.A., Elhadary, A.M.A., Abuelmagd, M.A., Ali, S., Rizwan, M (2019). Characterization and chromium biosorption potential of extruded polymeric substances from *Synechococcus mundulus* induced by acute dose of gamma irradiation. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(31), 31998–32012.
- Ianeva, O.D (2009). Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals. *Mikrobiolohichnyĭ Zhurnal*. 71(6), 54–65.
- Imron, M.F., Kurniawan, S.B., & Abdullah, S.R.S (2021). Resistance of bacteria isolated from leachate to heavy metals and the removal of Hg by *Pseudomonas aeruginosa* strain FZ-2 at different salinity levels in a batch biosorption system. *Sustainable Environment Research*. 31(1), 1–13.
- Jacques, R.A., Lima, E.C., Dias, S.L.P., Mazzocato, A.C., Pavan, F.A (2007). Yellow passion-fruit shell as biosorbent to remove Cr(III) and Pb(II) from aqueous solution. *Separation and Purification Technology*, 57(1), 193–198.
- Jaya, M., Chinnannan, K., Rijuta, G., Smita, S., Desika, P., Kadirvelu, K., Arivalagan, P (2018). Biological approaches to tackle heavy metal pollution: A survey of literature. *Journal of Environmental Management*. 217, 56-70.
- Juwarkar, A.A., Yadav, S.K (2010). Bioaccumulation and Biotransformation of Heavy Metals. *Bioremediation Technology*. 266–284.
- Kaci, Y., Heyraud, A., Barakat, M., Heulin, T (2005). Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria) : Characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Research in Microbiology*. 156(4), 522–531.
- Kenney, J.P.L., Fein, J.B., (2011). Importance of extracellular polysaccharides on proton and Cd binding to bacterial biomass: A comparative study. *Chemical Geology*. 286,109-117.
- Kikuchi, T., Tanaka, S (2012). Biological removal and recovery of toxic heavy metals in water environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 42(10), 1007–1057.
- Kim, I.H., Choi, J.H., Joo, J. O., Kim, Y.K., Choi, J.W., Oh, B.K (2015). Development of a

microbe-zeolite carrier for the effective elimination of heavy metals from seawater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(9), 1542–1546.

- Klotz, L.O., Kröncke, K.D., Buchczyk, D.P., Sies, H (2003). Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *Journal of Nutrition*. 133(5), 1448-1451.
- Kostal, J.R., Yang, C.H., Mulchandani, N.A., Chen, W (2004). Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. *Appl Environ Microbiol*. 70(8), 4582–4587.
- Kurniawan, T.A., Chan, G.Y.S., Lo, W.H., Babel, S (2006). Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chemical Engineering Journal*. 118(1–2), 83–98.
- Laidi, O., Merzouki, M., EL Karrach, K., Benlemlih, M (2015). Brassware wastewater treatment optimization in the city of Fez with sequencing batch reactor using activated sludge. *J. Mater. Environ. Sci*. 6(6), 1562–1569.
- Laspidou, C.S., Rittmann, B.E (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. In *Water Research*. 36(11), 2711–2720.
- Ledin, M (2000). Accumulation of metals by microorganisms - processes and importance for soil systems. *Earth Science Reviews*. 51(1–4), 1–31.
- Li, Q., Csetenyi, L., Gadd, G.M. (2014). Biomineralization of metal carbonates by *Neurospora crassa*. *Environmental Science and Technology*. 48(24), 14409–14416.
- Li, W.W., Yu, H.Q (2014). Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. *Bioresource Technology*. 160, 15–23.
- Li, X., Li, D., Yan, Z., Ao, Y (2018). Adsorption of cadmium by live and dead biomass of plant growth-promoting rhizobacteria. *RSC Advances*. 8(58), 33523–33533.
- Limousy, L., Jeguirim, M., Dutournié, P., Kraiem, N., Lajili, M., Said, R (2013). Gaseous products and particulate matter emissions of biomass residential boiler fired with spent coffee grounds pellets. *Fuel*. 107, 323–329.
- Liu, C., Wang, K., Jiang, J.H., Liu, W. J., Wang, J.Y. (2015). A novel bioflocculant produced by a salt-tolerant, alkaliphilic and biofilm-forming strain *Bacillus agaradhaerens* C9 and its application in harvesting *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Biochemical Engineering Journal*. 93, 166–172.
- Liu, W., Hao, Y., Jiang, J., Zhu, A., Zhu, J., Dong, Z (2016). Production of a bioflocculant from *Pseudomonas veronii* L918 using the hydrolyzate of peanut hull and its application in

the treatment of ash-flushing wastewater generated from coal fired power plant. *Bioresource Technology*. 218, 318–325.

- Malwade, K., Lataye, D., Mhaisalkar, V., Kurwadkar, S., Ramirez, D (2016). Adsorption of hexavalent chromium onto activated carbon derived from *Leucaena leucocephala* waste sawdust : kinetics, equilibrium and thermodynamics. *International Journal of Environmental Science and Technology*.13(9), 2107–2116.
- Marchenko, O., Demchenko, V., Pshinko, G (2018). Bioleaching of heavy metals from sewage sludge with recirculation of the liquid phase : A mass balance model. *Chemical Engineering Journal*. 350, 429–435.
- Munees, A., Abdul, M (2011). Bioaccumulation of Heavy Metals by Zinc Resistant Bacteria Isolated from Agricultural Soils Irrigated with Wastewater. *Bacteriology Journal*. 1-8.
- Nagvenkar, G.S., Ramaiah, N (2010). Arsenite Tolerance and Biotransformation Potential in Estuarine Bacteria. *Ecotoxicology*. 19(4), 604-613.
- Namslauer, A., Brzezinski, P (2004). Structural elements involved in electron-coupled proton transfer in cytochrome c oxidase. *FEBS Letters*. 567(1),103–110.
- Nanjani, S.G., Soni, H.P (2012). Isolement et caractérisation des organismes extrêmement halotolérants et halophiles de Dwarka et Veraval. *Pharmacy and Biological Sciences*. 2(2), 20-25.
- Nayak, A.K., Panda, S.S., Basu, A., Dhal, N.K (2018). Enhancement of toxic Cr (VI), Fe, and other heavy metals phytoremediation by the synergistic combination of native *Bacillus cereus* strain and *Vetiveria zizanioides* L. *International Journal of Phytoremediation*. 20(7), 682–691.
- NdeddyAka, R.J., Babalola, O.O (2016). Effect of bacterial inoculation of strains of *pseudomonas aeruginosa*, *alcaligenes feacalis* and *bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *brassica juncea*. *International Journal of Phytoremediation*.18(2), 200–209.
- Nies, D H., Silver, S (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Indust Microbiol*. 14, 186-199.
- Noroozi, M., Amoozegar, M.A., Pourbabae, A.A., Naghavi, N.S., Nourmohammadi, Z (2017). Isolation and characterization of mercuric reductase by newly isolated halophilic bacterium, *Bacillus firmus* MN8. *Global J. Environ. Sci. Manage*. 3(4), 427–436.
- Padmavathiamma, P.K., Li, L.Y (2007). Phytoremediation technology : Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*. 184(1), 105–126.
- Pandey,G., Madhuri,S (2014). Heavy Metals Causing Toxicity in Animals and Fishes.

Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences. 2(2), 17-23.

- Pathak, M., Devi, A., Bhattacharyya, K.G., Sarma, H.K., Subudhi, S., Lal, B (2015). Production of a non-cytotoxic bioflocculant by a bacterium utilizing a petroleum hydrocarbon source and its application in heavy metal removal. RSC Advances. 5(81), 66037–66046.
- Pennacchio, A., Ventorino, V., Cimini, D., Pepe, O., Schiraldi, C., Inverso, M., Faraco, V (2018). Isolation of new cellulase and xylanase producing strains and application to lignocellulosic biomasses hydrolysis and succinic acid production. Bioresource Technology. 259, 325–333.
- Rajkumar, M., Sandhya S., Prasad M.N, Freitas, H (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. Biotechnol Adv. 30(6), 1562–1574.
- Ramrakhiani, L., Ghosh, S., Majumdar, S (2016). Surface Modification of Naturally Available Biomass for Enhancement of Heavy Metal Removal Efficiency, Upscaling Prospects, and Management Aspects of Spent Biosorbents : A Review. Applied Biochemistry and Biotechnology. 180(1), 41–78.
- 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.
- Santos, H.F., Carmo, F.L., Paes, J.E.S., Rosado, A.S., Peixoto, R.S (2011). Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. Water, Air, and Soil Pollution. 216(1-4),329–350.
- Sarret, G., Avoscan, L., Carriere, M., Collins, R., Geoffroy, N., Carrot, F., Coves, J., Gouget, B (2005). Chemical Forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 Exposed to Selenite and Selenate. Applied and Environmental Microbiology. 71, 2331-2337.
- Semerjian, L., Ayoub, G.M (2003). High-pH-magnesium coagulation-flocculation in wastewater treatment. Advances in Environmental Research. 7(2), 389–403.
- Serpaud, B., Casteignau, M., Matejka, G (1994). Heavy metal adsorption (Cu ,Zn, Cd and Pb) by superficial stream sediments: effects of pH, temperature and sediment composition. Journal of Water Science. 7(4), 343–365.
- Sriprang, R., Hayashi, M., Ono, H., Takagi, M., Hirata, K., Murooka, Y (2003). Enhanced accumulation of Cd by a Mesorhizobium sp. transformed with a gene from Arabidopsis thaliana coding for phytochelatase synthase. Appl Environ Microbiol. 69, 1791–1796.
- Touhami, N.O., Améziane, F., Jaïdi, L (2014). Nouvelles zones d'activités et redynamisation de l'artisanat traditionnel au Maroc : Le cas de la dinanderie dans la zone d'Aïn Nokbi à Fès.

Critique économique. (32)

- Wang, J.L., Chen, C (2009). Biosorbents for Heavy Metals Removal and Their Future. *Biotechnology Advances*. 27, 195-226.
- Wei, W., Wang, Q., Li, A., Yang, J., Ma, F., Pi, S., Wu, D (2016). Biosorption of Pb (II) from aqueous solution by extracellular polymeric substances extracted from *Klebsiella* sp. J1: Adsorption behavior and mechanism assessment. *Scientific Reports*. 6(1), 1–10.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils : A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *International Scholarly Research Notices*. 2011, 1-20.
- Xia, S., Zhang, Z., Wang, X., Yang, A., Chen, L., Zhao, J., Leonard, D., Jaffrezic-Renault, N (2008). Production and characterization of a bioflocculant by *Proteus mirabilis* TJ-1. *Bioresource Technology*. 99(14), 6520–6527.
- Yang, J., Wei, W., Pi, S., Ma, F., Li, A., Wu, D., Xing, J (2015). Competitive adsorption of heavy metals by extracellular polymeric substances extracted from *Klebsiella* sp. J1. *Bioresource Technology*. 196, 533–539
- Yilmaz, E.I (2003). Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Research in Microbiology*. 154(6), 409–415.
- Yue, Z.B., Li, Q., Li, C. chuan, Chen, T. hu, Wang, J (2015). Component analysis and heavy metal adsorption ability of extracellular polymeric substances (EPS) from sulfate reducing bacteria. *Bioresource Technology*. 194, 399–402.
- Zhang, X., Sun, J., Liu, X., Zhou, J (2013). Production and flocculating performance of sludge bioflocculant from biological sludge. *Bioresource Technology*. 146, 51–56.
- Zheng, Y., Ye, Z.L., Fang, X.L., Li, Y.H., Cai, W.M (2008). Production and characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus sp F19*. *Bioresource Technology*. 99(16), 7686–7691.
- Ziagova, M., Dimitriadis, G., Aslanidou, D., Papaioannou, X., Litopoulou Tzannetaki, E., Liakopoulou-Kyriakides, M (2007). Comparative study of Cd(II) and Cr(VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas* sp in single and binary mixtures. *Bioresource Technology*. 98(15), 2859–2865.