كلية العلوم و التقنيات فاس
ⵜⴰⵖⵉⵡⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⵎⴰⵙⵙⴰⵏⵉⵏ ⴷ ⵜⵙⵏⵉⴳⵉⵜⵉⵏ
Faculté des Sciences et Techniques de Fès

جامعة سيدي محمد بن عبد الله
ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵙⵉⴷⵉ ⵎⵓⵃⵎⵎⴰⴷ ⴱⵏ ⵄⴱⴷⵓⵍⵍⴰⵀ
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

N° d'ordre : 76/2023

Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales
Formation doctorale : Sciences et Génie de la Matière, de la Terre et de la Vie

Discipline : **Biologie**

Spécialité : **Microbiologie et Biotechnologie**

Laboratoire : **Ressources Naturelles et Environnement, Faculté Polydisciplinaire de Taza**

Thèse pour l'obtention de DOCTORAT

Bioremédiation des Effluents de Tanneries par des Bactéries Métallo-Résistantes et Réductrices du Cr(VI) : Valorisation par Irrigation

Préparée par : HARBOUL Kaoutar

Soutenue le 27 Octobre 2023 devant le jury :

Nom et prénom	Etablissement	Grade	Qualité
Pr. BOUKA Hassan	Faculté Polydisciplinaire de Taza	PES	**Président**
Pr. EL GHACHTOULI Naima	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	PES	Rapporteur
Pr. CHAHLAOUI Abdelkader	Faculté des Sciences de Meknès	PES	Rapporteur
Pr. MERZOUKI Mohammed	Faculté des Sciences Dhar el Mahraz de Fès	PES	Rapporteur
Pr. EL HASSOUNI Mohammed	Faculté des Sciences Dhar el Mahraz de Fès	PES	Examinateur
Pr. LOUAHLIA Said	Faculté Polydisciplinaire de Taza	PES	Examinateur
Pr. EL-KARKOURI Abdenbi	Faculté des Sciences Dhar el Mahraz de Fès	PH	Co-directeur de thèse
Pr. HAMMANI Khalil	Faculté Polydisciplinaire de Taza	PES	Directeur de thèse

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قال تعالى:

« أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجَ بِهِ مِنَ الثَّمَرَاتِ رِزْقًا لَكُمْ ﴿البقرة 22﴾»

« وَمَا أَنْزَلَ اللَّهُ مِنَ السَّمَاءِ مِنْ مَاءٍ فَأَحْيَا بِهِ الْأَرْضَ بَعْدَ مَوْتِهَا ﴿البقرة 164﴾»

« وَجَعَلْنَا مِنَ ٱلْمَآءِ كُلَّ شَىْءٍ حَىٍّ ﴿الأنبياء 30﴾»

Dédicace

À ma chère mère

À mon cher père

À mon cher mari

À ma petite fille

À mes sœurs et mon frère

À ma famille

À mes amies et amis

À tous ceux qui me sont chers.

"Ressentir de la gratitude et ne pas l'exprimer, c'est comme emballer un cadeau et ne pas le donner"

Remerciements

C'est un aspect agréable que j'ai maintenant l'occasion d'exprimer ma gratitude pour tous ceux qui ont rendu ce voyage de six ans de recherche plein de sentiment de réussite et d'accomplissement.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma sincère gratitude et mon respect à mes directeurs de thèse **Pr. Khalil HAMMANI** et **Pr. Abdenbi EL-KARKOURI** pour leurs encouragements, leur temps et leurs conseils tout au long de cette étude. Leur implication sincère dans les activités de recherche et leur écoute patiente ont nourri ma maturité intellectuelle dont je profiterai encore longtemps. Je leur suis reconnaissante de toutes les manières possibles et leur serai éternellement redevable d'avoir inculqué en moi des qualités de confiance, de persévérance et d'engagement. C'est un grand plaisir d'exprimer ma profonde gratitude au Pr. Hassan BOUKA Doyen de la Faculté Polydisciplinaire de Taza pour m'avoir accueilli et procuré les conditions et les moyens de recherche nécessaires pour la réussite de cette thèse.

Je remercie chaleureusement Pr. Said LOUAHLIA pour ses précieuses suggestions, ses encouragements et son aide pour atteindre mes objectifs.

Je voudrais étendre mes remerciements aux membres de jury, **Pr. BOUKA Hassan**, **Pr. EL GHACHTOULI Naima**, **Pr. CHAHLAOUI Abdelkader**, **Pr. MERZOUKI Mohammed**, **Pr. EL HASSOUNI Mohammed** et **Pr. LOUAHLIA Said**, de l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer ce travail.

Je suis extrêmement reconnaissante à tous les professeurs de la Faculté Polydisciplinaire de Taza et de la Faculté des Sciences et Techniques Fès et de l'Université Sidi Mohammed Ben Abdellah pour la formation académique et les connaissances scientifiques dont j'ai pu bénéficier tout au long de mon cursus universitaire.

J'aimerais pouvoir mentionner chacun individuellement pour m'encourager. C'est un honneur pour moi de transmettre mes salutations particulières au Pr. Taoufiq BENALI et Pr. Mohammed EL YAMANI pour leurs intérêts sincères, leurs encouragements continus, leurs précieuses suggestions et leur soutien optimiste. J'exprime ma gratitude et mes sincères remerciements à ma chère collègue doctorante Houda CHTIBI et doctorant Imad ALOUIZ qui m'ont été si proches et qui m'ont beaucoup aidée durant tout ce travail.

Des remerciements collectifs et individuels vont également à tous mes collègues chercheurs du laboratoire RNE.

Résumé

La dépollution des effluents industriels contaminés par le Cr(VI) en utilisant des procédés efficaces et économiques est très importante pour préserver l'environnement et par conséquent pour protéger la santé humaine. Aussi, et dans les conditions actuelles de sécheresse, il est recommandé de traiter les eaux polluées pour pouvoir les réutiliser. Les méthodes physico-chimiques de traitement et de dépollution sont largement utilisées, mais malgré leur efficacité elles ont montrés leurs limites en termes de coût et du non-respect de l'environnement en générant des sous-produits. Les travaux de recherche sur la bioremédiation des effluents contaminés par le Cr(VI) ont fait l'objet de plusieurs études approfondies pendant de nombreuses années.

Le présent travail de recherche vise à utiliser des bactéries métallo-résistantes dans la déchromatation des effluents de tanneries. Pour cela, six bactéries résistantes au chrome et à d'autres métaux lourds ont été isolées à partir du sol de mines de plomb, de cuivre et de fer abandonnées dans la région de Taza, au Maroc. Ces bactéries ont été identifiées par des méthodes moléculaires (PCR et séquençage) autant que : **i**) *Brachybacterium paraconglomeratum* ER41 (**CRB-1**), **ii**) *Staphylococcus aureus* CC1956 (**CRB-2**), **iii**) *Bacillus safensis* strain CCMM B29 (**CRB-3**), **vi**) *Bacillus pumilus* strain ATCC 7061 (**CRB-4**), **v**) *Staphylococcus succinus* subsp. *Succinus* strain AMG-D1 (**CRB-5**) et **vi**) *Staphylococcus gallinarum* strain VIII1 (**CRB-6**). Ces six bactéries ont montré leur efficacité à réduire rapidement et complètement le Cr(VI) à des concentrations élevées, dans des conditions optimales de pH (7 à 9) et de température (30 °C à 35 °C). La présence du cuivre et du Fer améliore considérablement l'efficacité de réduction du Cr(VI) par ces CRB. De plus, elles ont démontré leur aptitude à réduire efficacement le Cr(VI) en utilisant du glucose et du glycérol en tant que sources de carbone dans un milieu minimal. Aussi, la réduction des contaminations répétées du Cr(VI) par des cellules immobilisées, dans des billes d'alginate, et des cellules en suspension a montré leur efficacité en matière de détoxification du Cr(VI), que ce soit dans un environnement modifié ou non, et sur plusieurs cycles. L'utilisation de ces six bactéries en consortium a montré leur efficacité dans le traitement des effluents de tanneries contaminés par le Cr(VI), avec un taux d'abattement considérable pour les divers polluants : une réduction de 79% de la Demande Chimique en Oxygène (DCO), une réduction de 88% des ions nitrate (NO_3^-), une réduction de 93% des ions sulfates (SO_4^{2-}), une réduction de 85% de l'azote total Kjeldahl (NTK) et une élimination totale du Cr(VI) à hauteur de 100%.

Les études des isothermes d'adsorption ont révélé que le modèle de Langmuir fournissait une description satisfaisante du processus d'adsorption du Cr(VI). En outre, les analyses réalisées à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB), de la spectroscopie dispersive d'énergie des rayons X (EDX) et de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ont confirmé à la fois la résistance considérable et la capacité de nos cellules bactériennes à adsorber et réduire efficacement le Cr(VI). Dans le but de cerner et de localiser les compartiments cellulaires impliqués dans le mécanisme de réduction du Cr(VI), les expériences menées sur les cellules au repos, perméabilisées et des fractions subcellulaires ont révélé que l'élimination du Cr(VI) était principalement le résultat d'une réduction enzymatique, impliquant des protéines localisées à la fois dans la membrane cellulaire et dans la fraction cytosolique. De plus, une électrophorèse sur gel SDS-PAGE a indiqué la présence d'une protéine d'un poids moléculaire d'environ 30 à 35 kDa, suggérant un rôle potentiel de cette protéine dans le processus de réduction du chrome.

En fin, les effluents déchromatés par ces bactéries ont été utilisés dans l'irrigation. Pour cela, un test d'hypersensibilité a été effectué sur les feuilles de tabac. Les résultats obtenus ont montré l'absence d'effets phytopathogènes indésirables de ces bactéries sur ces plantes. Ensuite, des essais d'irrigation des plants de tomates ont été réalisés sous serre, durant les mois d'Avril et de Mai. Ces essais ont non seulement confirmé l'efficacité du traitement biologique des effluents de tanneries, mais ont également mis en évidence la capacité de nos bactéries à stimuler la croissance des plants de tomates. Les plants irrigués avec les effluents traités ont montré une accumulation significative de pigments chlorophylliens, caractérisée par une fluorescence élevée. De plus, elles ont présenté une coloration verte plus intense, avec un feuillage plus abondant et une floraison plus prolifique par rapport à ceux irrigués avec les effluents bruts. Cependant, les concentrations d'osmolytes tels que les protéines, les sucres et la proline étaient modérément élevées en raison de la forte présence des ions de sodium dans les effluents des tanneries.

Cette étude montre la capacité de nos bactéries de dépolluer les eaux usées contaminées par le Cr(VI). Ceci ouvre des perspectives très encourageantes pour les utiliser, en consortiums, dans les systèmes de traitement des effluents de tanneries.

Mots clés : Bioremédiation, Bactéries, Immobilisées, Perméabilisées, Consortium, Fractions subcellulaires, Réduction enzymatique, Effluents de tanneries, Irrigation.

Abstract

The decontamination of industrial effluents contaminated with Cr(VI) using efficient and cost-effective processes is crucial for preserving the environment and, consequently, protecting human health. Also, in the current conditions of drought, it is recommended to treat polluted water for reuse. Physico-chemical methods of treatment and decontamination are widely used, but despite their effectiveness, they have shown limitations in terms of cost and environmental impact by generating by-products. Research on the bioremediation of Cr(VI)-contaminated effluents has been the subject of numerous in-depth studies for many years.

This research aims to use metal-resistant bacteria in the dechromation of tannery effluents. To achieve this, six bacteria resistant to chromium and other heavy metals were isolated from the soil of abandoned lead, copper, and iron mines in the Taza region, Morocco. These bacteria were identified through molecular methods (PCR and sequencing) as follows: **i**) *Brachybacterium paraconglomeratum* ER41 (**CRB-1**), **ii**) *Staphylococcus aureus* CC1956 (**CRB-2**), **iii**) *Bacillus safensis* strain CCMM B29 (**CRB-3**), **vi**) *Bacillus pumilus* strain ATCC 7061 (**CRB-4**), **v**) *Staphylococcus succinus* subsp. *Succinus* strain AMG-D1 (**CRB-5**) and **vi**) *Staphylococcus gallinarum* strain VIII1 (**CRB-6**). These six bacteria demonstrated their efficiency in rapidly and completely reducing Cr(VI) at high concentrations under optimal pH (7 to 9) and temperature (30 °C to 35 °C) conditions. The presence of copper and iron significantly improved the reduction efficiency of Cr(VI) by these CRBs. Moreover, they showed their ability to effectively reduce Cr(VI) using glucose and glycerol as carbon sources in a minimal medium. Additionally, the reduction of repeated Cr(VI) contaminations by immobilized cells in alginate beads and suspended cells demonstrated their effectiveness in detoxifying Cr(VI), whether in a modified or unmodified environment, and over multiple cycles. The use of these six bacteria in a consortium proved effective in treating tannery effluents contaminated with Cr(VI), achieving a considerable reduction rate for various pollutants: a 79% reduction in Chemical Oxygen Demand (COD), an 88% reduction in nitrate ions (NO_3^-), a 93% reduction in sulfate ions (SO_4^{2-}), an 85% reduction in total Kjeldahl nitrogen (NTK), and a complete removal of Cr(VI) by 100%.

Isotherm studies revealed that the Langmuir model provided a satisfactory description of the Cr(VI) adsorption process. Furthermore, analyses using scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) confirmed both the considerable resistance and the ability of our bacterial cells to adsorb and effectively reduce Cr(VI). In order to identify and locate the cellular compartments involved in the Cr(VI) reduction mechanism, experiments on resting cells, permeabilized cells, and subcellular fractions revealed that Cr(VI) removal was mainly the result of enzymatic reduction, involving proteins located in both the cell membrane and the cytosolic fraction. Moreover, SDS-PAGE electrophoresis indicated the presence of a protein with a molecular weight of approximately 30 to 35 kDa, suggesting a potential role of this protein in the chromium reduction process.

Finally, the dechromated effluents by these bacteria were used for irrigation. For this, a hypersensitivity test was conducted on tobacco leaves, showing no undesirable phytopathogenic effects of these bacteria on the plants. Subsequently, irrigation tests on tomato plants were carried out in a greenhouse during the months of April and May. These trials not only confirmed the effectiveness of the biological treatment of tannery effluents but also highlighted the ability of our bacteria to stimulate the growth of tomato plants. Plants irrigated with treated effluents showed a significant accumulation of chlorophyll pigments, characterized by high fluorescence. Additionally, they exhibited a more intense green color, with denser foliage and more prolific flowering compared to those irrigated with raw effluents. However, concentrations of osmolytes such as proteins, sugars, and proline were moderately elevated due to the high presence of sodium ions in tannery effluents.

This study demonstrates the ability of our bacteria to decontaminate wastewater contaminated with Cr(VI). This opens up very encouraging prospects for their use in consortia in tannery effluent treatment systems.

Keywords: Bioremediation, Bacteria, Immobilized, Permeabilized, Consortium, Subcellular fractions, Enzymatic reduction, Tannery effluents, Irrigation.

ملخص

تعد معالجة النفايات السائلة الصناعية الملوثة بالكروم السداسي باستخدام عمليات فعالة واقتصادية أمرًا مهمًا للغاية للحفاظ على البيئة وبالتالي حماية صحة الإنسان. وأيضاً، وفي ظروف الجفاف الحالية، ينصح بمعالجة المياه الملوثة للتمكن من إعادة استخدامها. تُستخدم الطرق الفيزيائية والكيميائية للمعالجة وإزالة التلوث على نطاق واسع، ولكن على الرغم من فعاليتها فقد أظهرت حدودها من حيث التكلفة وعدم احترام البيئة من خلال توليد منتجات ثانوية. كان العمل البحثي حول المعالجة الحيوية للنفايات السائلة الملوثة موضوعًا للعديد من الدراسات المتعمقة على مدار سنوات عديدة بالكروم السداسي.

يهدف هذا العمل البحثي إلى استخدام البكتيريا المقاومة للمعادن في عملية نزع اللون من نفايات الدباغة السائلة. ولهذا السبب، تم عزل ستة بكتيريا مقاومة للكروم والمعادن الثقيلة الأخرى من تربة مناجم الرصاص والنحاس والحديد المهجورة في منطقة تازة بالمغرب. تم التعرف على هذه البكتيريا بالطرق الجزيئية على النحو التالي:

i) *Brachybacterium paraconglomeratum* ER41 (CRB-1)، ii) *Staphylococcus aureus* CC1956 (CRB-2)، iii) *Bacillus safensis* سلالة CCMM B29 (CRB-3 ، vi) سلالة *Bacillus pumilus* ATCC 7061 (CRB-4)، v) *Staphylococcus succinus* subsp. سلالة *Succinus* AMG-D1 (CRB-5) و *Staphylococcus galinarum* VIII1 (CRB-6).

أظهرت هذه البكتيريا الستة فعاليتها في تخفيض الكروم السداسي بسرعة وبشكل كامل في تراكيز عالية تحت شروط الحموضة المثلى بين 7 و9 ودرجات حرارة تتراوح بين 30 و35 درجة مئوية. حضور النحاس والحديد يعزز بشكل كبير كفاءة انخفاض الكروم السداسي بواسطة هذه البكتيريا. علاوة على ذلك، أظهرت قدرتها على الحد من الكروم السداسي بفعالية باستخدام الجلوكوز والجليسيرول كمصادر للكربون في وسط قليل. دراسة مقارنة للحد من تلوثات الكروم السداسي المتكررة باستخدام خلايا مثبتة في الكريات الألجنيت وخلايا حرة أكدت بقوة فعاليتها في التخلص من الكروم السداسي، سواء في بيئة معدلة أم لا، على مدى عدة دورات، مع الحفاظ على قدرتها على الحد من هذا المعدن.

أظهرت دراسات الاختزال الاجتذابي أن نموذج لانجمويير وفر دراسة مرضيَّة لعملية امتصاص الكروم السداسي. بالإضافة إلى ذلك، أكدت التحاليل باستخدام الميكروسكوب الإلكتروني، وطيف الأشعة السينية المنتشرة للطاقة وطيف الأشعة تحت الحمراء بتحويل فوريه على مقاومة البكتيريا لامتصاص وتخفيض الكروم السداسي بفعالية. ومن أجل تحديد الأجزاء الخلوية المشاركة في آلية تخفيض الكروم السداسي، أجريت تجارب على الخلايا الراقدة والخلايا النفاذة والجزيئات الخلوية الفرعية، وكشفت على أن إزالة الكروم السداسي كانت في المقام الأول نتيجة لتخفيض إنزيمي، يشمل بروتينات موجودة في الغشاء الخلوي والجزء السيتوبلازمي. وجود بروتين بوزن جزيئي يبلغ حوالي 30 و35 كيلو دالتون يشير إلى دور محتمل لهذا البروتين في عملية تخفيض الكروم.
أظهرت تكتلات البكتيريا الستة فعاليتها في معالجة مياه تصنيع الجلود الملوثة بالكروم السداسي، مما أدى إلى تقليل كبير للطلب الكيميائي على الأوكسجين بنسبة 79%، وتخفيض بنسبة 88% لأيونات ذلك، وجود النيترات، وبنسبة 93% لأيونات الكبريت، وتخفيض بنسبة 85% للنيتروجين الكيميائي الكلي وإزالة تامة للكروم السداسي بنسبة 100%. الهدف الرئيسي لهذه المعالجة البيولوجية هو إعادة استعمال المياه المعالجة للاستخدام في الري الزراعي. أظهرت الاختبارات الأولية للحساسية على أوراق نبات التبغ عدم وجود تأثيرات نباتية غير مرغوبة لهذه السلالات على النباتات. بعد ذلك، تم إجراء اختبارات الري لنباتات الطماطم في بيت زراعي من أبريل إلى مايو تحت ظروف مراقبة. أكدت هذه التجارب ليس فقط فعالية المعالجة البيولوجية لمياه تصنيع الجلود ولكن أيضًا أظهرت قدرة البكتيريات المدروسة على تعزيز نمو النبات. أظهرت النباتات التي تم ريها بالمياه المعالجة تراكمًا كبيرًا من الصبغات الكلوروفيلية، والتي تتميز بإشعاع عالٍ. علاوة على ذلك، عرضت لونًا أخضرًا أكثر كثافة وأوراقًا أكثر كثافة وازدهارًا أكثر نمواً مقارنة بتلك التي تم ريها بالمياه غير المعالجة. ومع ذلك، ارتفعت تراكيز المركبات الأسمولية مثل البروتينات والسكريات والبرولين إلى حد معتدل بسبب وجود نسب عالية من أيونات الصوديوم في مياه تصنيع الجلود. النتائج المحصلة في هذه الدراسة تقدم افاقاً مشجعة لاستخدام تكتلات البكتيريا الستة المختارة في عملية تنقية الكروم السداسي تحت ظروف بيئية متنوعة، مع التركيز على إمكانية تطبيقها في أنظمة معالجة مياه الصرف الملوثة بالكروم السداسي.

الكلمات الرئيسية: المعالجة الحيوية، البكتيريا، المثبت، النفاذي، الكونسورتيوم، الأجزاء التحت خلوية، الاختزال الأنزيمي، مخلفات الدباغة، الري.

Sommaire

Dédicace iii
Remerciements iv
Résumé v
Abstract vi
ملخص vii
Sommaire viii
Liste des abréviations xiv
Liste des figures xvi
Production scientifique xxi
Introduction générale 1
Etude bibliographique 5
I. Généralités sur la pollution métallique des ressources hydriques 6
1. Eléments traces métalliques 6
2. Pollution métallique à l'échelle internationale 7
3. Pollution métallique à l'échelle nationale 9
II. Le chrome dans l'environnement 10
1. Cycle du chrome 11
2. Spéciation du chrome 12
3. Transport du chrome 12
4. Toxicité du chrome 13
III. Procédés de remédiation des environnements pollués par le Cr(VI) 15
1. Méthodes physico-chimiques 15
2. Méthodes biologiques 17
2.1. Phytoremédiation 18
2.2. Bioremédiation 19
a. Bioatténuation 20
b. Biostimulation 20
c. Bioaugmentation 20
IV. Remédiation biologique du Cr(VI) 21
1. Par les plantes 21
2. Par les algues 22
3. Par les champignons 22
4. Par les levures 23
5. Par les bactéries 25

V. Mécanismes de résistance et de réduction du Cr(VI) chez les microorganismes 28
1. Système d'efflux 29
2. Biosorption et Bioaccumulation 30
3. Réduction du Cr(VI) 31
3.1. Réduction aérobie 32
3.2. Réduction anaérobie 33
3.3. Réduction extracellulaire 34
3.4. Réduction liée à la membrane 34
3.5. Réduction intracellulaire 34
VI. Valorisation des effluents de tanneries traités par irrigation 36
1. Effluents de l'industrie du tannage 36
2. Valorisation des effluents de tanneries 37
Matériel et méthodes 40
I. Présentation et caractérisation des sites d'échantillonnage 41
1. Présentation des sites d'échantillonnage 41
2. Prélèvement des échantillons du sol 41
3. Caractérisation physico-chimique des échantillons du sol 42
3.1. Mesure de la température et du pH 42
3.2. Mesure de la conductivité électrique 42
3.3. Dosage du chrome total et des autres métaux 42
II. Isolement, criblage, caractérisation et identification des bactéries résistantes au Cr(VI) et aux autres métaux lourds 43
1. Dénombrement microbien du sol 43
2. Isolement et purification des isolats bactériens 43
3. Tests de résistance aux métaux 44
3.1. Test semi quantitatif 44
3.2. Test quantitatif 44
4. Caractérisation morphologique, biochimique et métabolique des isolats bactériens 45
4.1. Caractérisation morphologique 45
4.2. Caractérisation biochimique et métabolique des isolats bactériens 46
a. Test catalase 46
b. Test oxydase 46
c. Production de l'acide indole-3-acétique (AIA) 46
d. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) 46
e. Production des exopolysaccharides (EPS) 47
f. Solubilisation du phosphate tricalcique ; étude qualitative 47
g. Solubilisation du phosphate tricalcique ; étude quantitative 47

4.3. Résistance à la salinité 48
4.4. Résistance aux antibiotiques 48
4.5. Test d'antagonisme 48
5. Identification moléculaire des isolats bactériens 48
5.1. Extraction rapide de l'ADN 49
5.2. Amplification PCR 49
5.3. Séquençage et analyse bioinformatique des séquences 50
5.4. Construction de l'arbre phylogénétique 50
6. Conservation des souches bactériennes 50
7. Mesure de la croissance bactérienne 50
III. Optimisation de différents paramètres environnementaux pour la réduction du Cr(VI) et la croissance bactérienne 51
1. Effet de différents paramètres environnementaux sur la réduction du Cr(VI) 51
1.1. Effet du pH 51
1.2. Effet de la température 51
1.3. Effet de la concentration initiale du Cr(VI) 51
1.4. Effet de la présence d'autres métaux lourds 52
1.5. Effet des accepteurs d'électrons 52
1.6. Effet des donneurs d'électrons 52
1.7. Effet des protéines et de la viabilité cellulaire 52
2. Etude de la réduction du Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées 53
2.1. Réduction du Cr(VI) par les cellules libres 53
2.2. Réduction du Cr(VI) par les cellules immobilisées 53
2.3. Effet de la contamination répétée et du milieu sur la réduction du Cr(VI) 54
IV. Etude des mécanismes d'élimination du Cr(VI) par les souches bactériennes 54
1. Etude de l'adsorption du Cr(VI) sur la surface cellulaire 55
1.1. Modélisation des isothermes d'adsorption 55
a. Isotherme de Langmuir 56
b. Isotherme de Freundlich 56
1.2. Analyse par Microscopie Electronique à Balayage associée à la Microanalyse par Energie Dispersive de rayons (MEB-EDX) 57
1.3. Analyse par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) 57
2. Etude de la réduction du Cr(VI) par les souches bactériennes 58
2.1. Réduction par les cellules au repos « Resting cells » 58
2.2. Réduction par les cellules perméabilisées « Permeabilized cells » 58
2.3. Réduction par les fractionnements cellulaires 59
2.4. Expression de l'activité chromate réductase 59
2.5. Dosage des protéines 59

2.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 60
V. Traitement d'effluent des tanneries contaminé par le Cr(VI) 60
1. Prélèvement de l'effluent 61
2. Caractérisation physico-chimique de l'effluent des tanneries 61
3. Traitement des effluents de tanneries par les isolats bactériens séparés et en consortiums 63
VI. Contribution à la valorisation de l'effluent traité par irrigation des plantes 63
1. Test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac 64
2. Irrigation des plantes de tomates 64
3. Mesure des paramètres de croissance, physiologiques et biochimiques 64
3.1. Trait de croissance 65
a. Mesure de la longueur et du poids 65
3.2. Traits physiologiques 65
a. Mesure de la fluorescence de la chlorophylle 65
b. Teneur en pigments chlorophylliens 65
3.3. Traits biochimiques 66
a. Teneur en proline 66
b. Teneur en sucres solubles 66
c. Teneur en protéines 66
3.4. Dosage des éléments métalliques 67
VII. Méthodes analytiques 67
1. Dosage du Cr(VI) 67
1.1. Préparation des solutions du dosage 67
1.2. Dosage du Cr(VI) en milieu liquide 67
2. Dosage du chrome total et des éléments métalliques 68
2.1. Dans le sol 68
2.2. Dans les effluents 68
2.3. Dans les plantes 68
VIII. Analyses statistiques 68
Résultats et Discussion 69
I. Caractérisation des sites d'étude et d'échantillonnage 70
II. Isolement, caractérisation et identification des bactéries résistantes au Cr(VI) et aux autres métaux lourds 71
1. Isolement de bactéries résistantes au Cr(VI) 71
2. Test de résistance aux métaux 71
3. Caractérisation morphologique 74
4. Caractérisation biochimique et métabolique des isolats bactériens 74
5. Résistance aux antibiotiques 77
6. Test d'antagonisme 78

7. Identification moléculaire 78
III. Optimisation de différents paramètres environnementaux pour la réduction du Cr(VI) et la croissance bactérienne 81
1. Dénombrement de la biomasse microbienne 81
2. Effet de différents paramètres environnementaux sur la réduction du Cr(VI) 81
2.1. Effet de pH 82
2.2. Effet de température 85
2.3. Effet de la concentration initiale du Cr(VI) 87
2.4. Effet de la présence d'autres métaux lourds 92
2.5. Effet des accepteurs d'électrons 93
2.6. Effet des donneurs d'électrons 95
2.7. Effet de la dénaturation des protéines et de la viabilité cellulaire 97
3. Etude de la réduction du Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées 98
3.1. Réduction du Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées 99
3.2. Réduction répétée par les cellules libres et immobilisées dans un milieu modifié et non modifié 100
IV. Etude des mécanismes d'élimination du Cr(VI) par les souches bactériennes 103
1. Etude de l'adsorption du Cr(VI) sur la surface cellulaire 103
1.1. Modélisation des isothermes d'adsorption 103
1.2. Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) couplé à la spectrométrie dispersive en énergie des rayons X (EDX) 106
1.3. Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) 110
2. Etude de la réduction du Cr(VI) par les souches bactériennes 112
2.1. Réduction par les cellules perméabilisées et au repos « Resting cells » 112
2.2. Réduction par les fractionnements cellulaires 115
3. Expression et identification de la chromate réductase 117
V. Traitement des effluents de tanneries contaminés par le Cr(VI) 119
1. Caractérisation physico-chimique des effluents de tanneries 119
2. Traitement de l'effluent des tanneries par les souches bactériennes séparément et en consortium 122
2.1. Evolution du pH 122
2.2. Réduction des nitrates 123
2.3. Réduction d'azote Kjeldhal (NTK) 124
2.4. Réduction des sulfates 126
2.5. Réduction de la DCO 127
2.6. Réduction du Cr(VI) 129
2.7. Analyse statistique multivariée 130
VI. Contribution à la valorisation de l'effluent bioremédié par irrigation 134

1. Test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac 134
2. Irrigation des plantes de tomates 135
2.1. Traits de croissance 135
2.2. Traits physiologiques 138
a. Mesure de la fluorescence de la chlorophylle (Fv/Fm) et de la teneur en pigments chlorophylliens 138
2.3. Traits biochimiques 139
a. Teneur en sucres, protéines et proline 139
2.4. Teneur en éléments métalliques 141
2.5. Analyse statistique multivariée 143
Conclusion et perspectives 146
Références bibliographiques 150
Annexe 194

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales
AIA : Acide Indole-3-Acétique
APEEU : Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis
ATB : Antibiotique
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BSR : Bactéries sulfato-réductrices
CE : Conductivité Electrique
Chl : Chlorophylle
ChrR : Chromate réductase
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
Cr : Chrome
Cr(III) : Chrome trivalent
Cr(IV) : Chrome tétravalent
Cr(V) : Chrome pentavalent
Cr(VI) : Chrome hexavalent
CRB : Chromium-reducing bacteria
DBO : Demande Biologique en Oxygène
DCO : Demande Chimique en Oxygène
DL_{50} : Dose Létale médiane
DO : Densité Optique
DPC : S-diphénylcarbazide
EDX : Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy
EPS : Exopolysaccharides
ETM : Eléments Traces Métalliques
FAO : Food and Agriculture Organization
HCN : Hydrogen cyanide
ICP-AES : Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer
ISP : Indice de Solubilisation de Phosphate
LB : Luria Bertani
LSD : Least Significant Difference
MEB : Microscope Electronique à Balayage
MET : Microscope Electronique à Transmission
MF : Matière Fraîche
MS : Matière Sèche
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBRIP : National Botanical Research Institue Phosphate
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NO_3^- : Nitrate
NTK : Total Kjeldahl Nitrogen
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PA : Partie Aérienne
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH : Potentiel Hydrogène
PR : Partie Racinaire
PSII : Photosystème II
RH : Réaction d'hypersensibilité
ROS : Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE : Sodium Lauryl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SO_4^{2-} : Sulfate
SPAD : Single-Photon Avalanche Diode
TSS : Teneur en Sucres Solubles
UE : Union Européenne
UV : Ultra-Violet
UFC : Unités Formant Colonies
WHO : World Health Organization
YieF : Chromate réductase, Class I, flavoprotéine

Liste des figures

Figure 1 : Tableau de Mendeleïev (Bauvais, 2015). 6
Figure 2 : Cycle du chrome. 11
Figure 3 : Différentes sources de chrome et leur implication dans l'induction du stress oxydatif chez les plantes (Panda and Choudhury, 2005). 15
Figure 4 : Représentation schématique de diverses méthodes d'assainissement physique du chrome des eaux usées (Jobby et al., 2018)..... 17
Figure 5 : Représentation schématique des différentes stratégies de phytoremédiation (Favas et al., 2014)..... 19
Figure 6 : Réactivité des bactéries *vis-à-vis* des métaux. 28
Figure 7 : Mécanismes de résistance des microorganismes *via* la réduction intracellulaire du Cr(VI) en Cr(III) et son éjection par le système d'efflux (Desjardin, 2002). 29
Figure 8 : Mécanismes de la réduction enzymatique de Cr(VI) dans des conditions aérobies et anaérobies (Cheung and Gu, 2007). 33
Figure 9 : Les mécanismes de résistance et de réduction du Cr(VI) par une cellule microbienne..... 35
Figure 10 : Schéma des opérations du processus de fabrication du cuir et du flux des eaux usées (Aboulhassan et al., 2008). 37
Figure 11 : Démarche de traitement et d'utilisation des effluents pollués au Cr(VI) par des bactéries.39
Figure 12 : Localisation géographique des différents sites d'échantillonnage..... 41
Figure 13 : Station de prélèvement des effluents des tanneries de la zone industrielle Ain Nokbi Fès Maroc. 61
Figure 14 : Arbre phylogénétique basé sur le séquençage du gène d'ARNr 16S des six souches bactériennes montrant la relation entre ces bactéries et d'autres ayant un pourcentage de similitude supérieur à 97 % à l'aide de l'algorithme Neighbor-Joining (NJ) analysé par le logiciel MEGA11. Les numéros d'accession sont mentionnés après le nom de la souche et les nombres figurant devant les nœuds indiquent les taux de bootstrap. La barre d'échelle 0,1 indique le nombre de substitution par position de nucléotide..... 80
Figure 15 : Effet du pH sur la réduction du Cr(VI) et sur la croissance de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu LB additionné de 100 mg/L de Cr(VI), après 48 h d'incubation à 30°C. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher). 83
Figure 16 : Effet de la température sur la réduction du Cr(VI) et la croissance de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu LB additionné de 100 mg/L de Cr(VI), après 48 h d'incubation à pH optimal. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher). 86
Figure 17 : Effet de différentes concentrations initiales du Cr(VI) (**a'**) 50 mg/L, (**b'**) 100 mg/L, (**c'**) 200 mg/L et (**d'**) 300 mg/L) sur la réduction du Cr(VI) et la croissance de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu LB aux conditions optimales de pH et de températures. 89
Figure 18 : Effet de la présence des métaux lourds (Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+} et Pb^{2+}) à 100 mg/L ou (Cd^{2+} et Hg^{2+}) à 10 _mg/L, sur la réduction du Cr(VI) à 100 mg/L par **(a)** *B. paraconglomeratum*, **(b)** *S. aureus*, **(c)** *B. safensis*, **(d)** *B. pumilus*, **(e)** *S. succinus* et **(f)** *S. gallinarum* dans le milieu LB, après 24 h d'incubation aux conditions optimales. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5 %, LSD-Fisher)..... 92
Figure 19 : Effet des accepteurs d'électrons (10 mM) sur la réduction de 100 mg/L de Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S.*

gallinarum dans le milieu LB après 24 h d'incubation aux conditions optimales. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5 %, LSD-Fisher). 94
Figure 20 : Effet des donneurs d'électrons (10 mM) sur la réduction de 100 mg/L de Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu minimal M9 après 7 jours d'incubation aux conditions optimales. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher). 96
Figure 21 : Effet de la dénaturation protéiques et des inhibiteurs du métabolisme sur la réduction de 100 mg/L de Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* après 24 h d'incubation dans des conditions optimales de pH et de température. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher)..... 97
Figure 22 : Réduction de 100 mg/L de Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu LB dans des conditions optimales de pH et de température. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher). 99
Figure 23 : Réduction répétée de 100 mg/L de Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* en milieu LB (**a'**) non modifié et (**b'**) modifié dans des conditions optimales de pH et de température. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).... 102
Figure 24 : Modèle isotherme de Langmuir lors de la biosorption du Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum*. 104
Figure 25 : Modèle isotherme de Freundlich lors de la biosorption du Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum*. 105
Figure 26 : Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) des cellules témoins (**a**), (**c**), (**e**), (**g**), (**i**) et (**k**) et traitées (**b**), (**d**), (**f**), (**h**), (**j**) et (**l**) par 100 mg/L du Cr(VI) respectivement, pour *B. paraconglomeratum, S. aureus, B. safensis, B. pumilus, S. succinus* et *S. gallinarum*. 107
Figure 27 : Analyse de la composition élémentaire avec sonde EDX des cellules témoins (**a**), (**c**), (**e**), (**g**), (**i**) et (**k**) et traitées (**b**), (**d**), (**f**), (**h**), (**j**) et (**l**) par 100 mg/L du Cr(VI) respectivement, pour *B. paraconglomeratum, S. aureus, B. safensis, B. pumilus, S. succinus* et *S. gallinarum* 109
Figure 28 : Spectres IRTF des cellules témoins (**a**), (**c**), (**e**), (**g**), (**i**) et (**k**) et traitées (**b**), (**d**), (**f**), (**h**), (**j**) et (**l**) par 100 mg/L du Cr(VI) respectivement, pour *B. paraconglomeratum, S. aureus, B. safensis, B. pumilus, S. succinus* et *S. gallinarum*..... 111
Figure 29 : Gel SDS-PAGE des protéines totales des souches bactériennes résistantes au Cr(VI). **PM** : marqueur protéique ; CRB-1^{+} et CRB-2^{+}, CRB-3^{+}, CRB-4^{+}, CRB-5^{+} et CRB-6^{+} traitées par 100 mg/L de Cr(VI) ; CRB-1, CRB-2, CRB-3, CRB-4, CRB-5 et CRB-6 non traitées de *B. paraconglomeratum, S. aureus, B. safensis, B. pumilus, S. succinus* et *S. gallinarum*, respectivement..... 118
Figure 30 : Évolution du pH de l'effluent après traitement par les six souches et les consortiums bactériens..... 123
Figure 31 : Réduction des ions nitrates des effluents de tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher)..... 124
Figure 32 : Réduction de l'azote total d'effluent des tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5 %, LSD-Fisher)..... 125

Figure 33 : Réduction des ions sulfates des effluents de tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher)..... 126
Figure 34. Réduction de la DCO d'effluent de tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5 %, LSD-Fisher). 128
Figure 35 : Réduction du Cr(VI) d'effluent de tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher)..... 130
Figure 36 : Projections de l'analyse en composantes principales (ACP) sur les axes 1 et 2 représentant 97,44% de la variance totale. Les valeurs propres de la matrice de corrélation sont symbolisées par des vecteurs représentant les paramètres qui influencent le plus chaque axe, **pH** : potentiel d'hydrogène, **NO_3^-** : nitrate, **SO_4^{2-}** : sulfate, **NTK** : azote Kjeldhal, **DCO** : demane chimique en oxygène, **Cr(VI)** : chrome hexavalent..... 132
Figure 37 : Régression linéaire du Cr(VI) avec les autres paramètres de pollution de l'effluent des tanneries brut et traité..... 133
Figure 38 : Test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac. (**a**) : témoin, (**b**) : *A. tumefaciens*, (**c**) : *A. vitis* et (**d**) : *S. gallinarum*..... 135
Figure 39 : Croissance des plantes de tomates irriguées par (**a**) l'effluent non traité, (**b**) l'eau potable, (**c**) l'effluent traité traité par le consortium2 et (**d**) l'effluent traité par le consortium1..... 137
Figure 40 : Effet de différents traitements sur la teneur en (a) sucres solubles, (b) protéines et (c) proline (mg/g MF) des feuilles de plantes de tomates. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher)..... 140
Figure 41 : Projections PCA sur les axes 1 et 2 représentant 89,91% de la variance totale. Les valeurs propres de la matrice de corrélation sont symbolisées par des vecteurs représentant les traits qui influencent le plus chaque axe. Les 10 points représentent les différents traitements appliqués. **Chl-a** : chlorophylle a, **Chl-b** : chlorophylle b, **Chl total** : chlorophylle totale, **Car+Xan** : caroténoïdes et xanthophylles, **Fv/Fm** : fluorescence chlorophyllienne, **TSS** : teneur en sucres solubles, **Prot** : protéines, **Prol** : proline, **Cr** : chrome..... 144

Liste des tableaux

Tableau 1 : Normes de l'OMS pour l'eau douce (Bala et al., 2008). 9
Tableau 2 : Teneur en chrome dans diverses sources d'effluents et de rejets industriels. 10
Tableau 3 : Forme de chrome utilisé dans diverses industries (Das and Mishra, 2009). 13
Tableau 4 : Propriétés et effets du Cr(VI) sur les humains (Barnhart, 1997 ; Dayan and Paine, 2001 ; Martin and Griswold, 2009 ; Briffa et al., 2020)……..... 14
Tableau 5: Bioremédiation du Cr(VI) par certaines espèces de champignons et de levures. 25
Tableau 6 : Exemples de bactéries réductrices du Cr(VI). 27
Tableau 7 : Biosorption du chrome des effluents de tanneries par des souches bactériennes..... 31
Tableau 8 : Consommation d'eau par certains pays méditerranéens dans le secteur agricole durant la période 2000-2011 (Secat and Gallego, 2013). 38
Tableau 9 : Méthodes d'analyse des paramètres physico-chimiques des effluents de tanneries. 62
Tableau 10 : Propriétés physico-chimiques des échantillons du sol des mines et du sol de référence (**SR** : sol de référence) comparées avec les valeurs réglementaires. 70
Tableau 11 : Nombre d'isolats bactériens par site d'étude. 71
Tableau 12 : Concentration minimale inhibitrice des six isolats bactériens aux différents métaux sur milieu LB solide (mg/L). 72
Tableau 13 : Concentration minimale inhibitrice des six isolats bactériens aux différents métaux sur milieu LB liquide (mg/L). 73
Tableau 14 : Sites d'isolement et caractéristiques macroscopiques et microscopiques des six isolats bactériens. 74
Tableau 15 : Résultats de certaines activités biochimiques et métaboliques des isolats bactériens..... 75
Tableau 16 : Diamètre d'inhibition en cm après 48 h d'incubation à 30˚C. 77
Tableau 17 : Activité antagoniste des six isolats bactériens performants entre eux (diamètre d'inhibition en cm). 78
Tableau 18 : Identification des isolats bactériens par séquençage du gène de l'ARNr 16S. 79
Tableau 19: Coefficient de conversion entre la densité optique (600 nm), la concentration cellulaire (UFC/mL) et le poids sec (g/L) des six souches bactériennes. 81
Tableau 20 : Réduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes étudiées dans des conditions optimales par rapport aux autres bactéries réductrices du Cr(VI). 91
Tableau 21 : Paramètres des isothermes d'adsorption du Cr(VI) par les six souches bactériennes…106
Tableau 22 : Réduction des différentes concentrations initiales du Cr(VI) par les cellules perméabilisées et au repos des six souches bactériennes après 6 h d'incubation à température optimale. 113
Tableau 23 : Réduction de 25 mg/L du Cr(VI) par la fraction cytosolique et membranaire des six souches bactériennes après 6 h d'incubation à température optimale. 116
Tableau 24 : Caractéristiques physico-chimiques des effluents de tanneries de la zone industrielle Ain Nokbi en comparaison avec les valeurs de la norme marocaine. 120
Tableau 25 : Corrélations entre les analyses physico-chimiques des effluents de tanneries brut et traité. 131
Tableau 26 : Résultat de test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac..... 134
Tableau 27 : Influence des effluents de tanneries traités, bruts et l'eau potable sur la croissance des plantes de tomates. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher). 136

Tableau 28 : Effet des effluents de tanneries traités, bruts et l'eau potable sur la fluorescence de la chlorophylle (Fv/Fm) et les pigments photosynthétiques (mg/g MF) dans les feuilles de tomates. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher). 138
Tableau 29 : Accumulation comparative des métaux (µg/g MS) dans les feuilles des plantes de tomates irriguées avec les effluents traités, bruts et l'eau potable..... 142
Tableau 30 : Corrélations entre les traits analysés dans les feuilles de plantes de tomates cultivées sous différents traitements..... 143

Production scientifique

La publication des articles :

- **Harboul, K.,** Chtibi, H., Hammani, K., El Karkouri, A. Mechanisms of hexavalent chromium reduction by *Staphylococcus succinus*. International Journal of Environmental Science and Technology. **En cours de révision : Manuscript ID: JEST-D-22-02698. (2023).**
- **Harboul, K.,** Hammani, K., El Karkouri, Study of hexavalent chromium reduction by *Bacillus pumilus*. Journal of Microbiological Methods. **En cours de révision : MIMET-D-23-00098. (2023).**
- Sennaj, R., Dari, K., Timinouni, M., Benali, T., Fassouane, A., **Harboul, K.,** & Aassila, H. **(2023)**. Evaluation of Bioremediation Potentiality of Bacillus mojavensis Isolated from Wastewater for the Elimination of Reactive Yellow 145 and Methyl Orange. **Current Microbiology**, 80(10), 326.
- Benali, T., Lemhadri, A., **Harboul, K.,** Chtibi, H., Khabbach, A., Jadouali, S. M., ... & Akhazzane, M. **(2023)**. Chemical Profiling and Biological Properties of Essential Oils of Lavandula stoechas L. Collected from Three Moroccan Sites: In Vitro and In Silico Investigations. **Plants**, 12(6), 1413.
- Benali, T., Jaouadi, I., Ghchime, R., El Omari, N., **Harboul, K.,** Hammani, K., ... & Bouyahya, A. (**2022**). The Current State of Knowledge in Biological Properties of Cirsimaritin. **Antioxidants**, 11(9), 1842.
- **Harboul, K.,** El Aabedy, A., Hammani, K., & El-Karkouri, A. **(2023)**. Reduction of hexavalent chromium using *Bacillus safensis* isolated from an abandoned mine. **Environmental Technology**, 1-17.
- **Harboul, K.,** Alouiz, I., Hammani, K., & El-Karkouri, A. (**2022**). Isotherm and kinetics 0modeling of biosorption and bioreduction of the Cr(VI) by *Brachybacterium paraconglomeratum* ER41. **Extremophiles**, 26(3), 1-14.
- **Harboul, K.,** El Yamani, M., Hammani, K., & El-Karkouri, A. (**2022**). Study of potential capacity for Cr(VI) reduction by *Staphylococcus gallinarum* strain VIII1 immobilized, resting and permeabilized. **International Journal of Environmental Studies**, 1-18.

- El Karkouri, A., **Harboul, K.,** Arroud, H., & Hassouni, M. E. (**2019**). Hexavalent chromium removal from a tannery effluent by a bacterial consortium. **Moroccan Journal of Chemistry**, 7(4), 7-4.

Les communications orales et affichées :

- **Harboul, K.,** Hammani, K., El Karkouri, A. Mechanisms of Cr(VI) removal and evaluation of chromate reductase activity in the cytosolic fraction of *Bacillus pumilus*. La 5ème Edition Du Congres International Des Etudes Sur L'eau Et L'environnement "CI3E'23". **9-11 Mars 2023 à l'Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Al-Hoceima.**
- Chtibi, H., **Harboul, K.,** Benali, T., Louahlia, S., Hammani, K. Antimicrobial activities of Cistus ladanifer from the province of Taza Northern Morocco. La 5ème Edition Du Congres International Des Etudes Sur L'eau Et L'environnement "CI3E'23". **9-11 Mars 2023 à l'Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Al-Hoceima.**
- Es-Sounni, B., **Harboul, K.,** Nakkabi, A., Elaaraj, I., Bakhouch, M., Benali, T., El Moualij, N., El Yazidi, M., Fahim, M. Novel Metal Complexes of Schiff Base Ligands: Synthesis, Characterization, Antibacterial and Antioxidant Investigations. Cinquième Colloque Maghrébin sur la Chimie Hétérocyclique "CMCH 5-2022". **13-15 Juillet 2022 à la Faculté des Sciences de Meknès**.
- Chtibi, H., **Harboul, K.,** Choukrad, A., Benali, T., Louahlia, S., Hammani, K. Antimicrobial Activities of *Micromeria graeca* from the Province of Taza Northen Morocco. 1er Congrès International sur les Ressources Naturelles : Recherches et Strategies pour un Développement Durable "RENA 2022". **26-28 mai 2022 à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès et à l'Ecole Nationale de l'Agriculture de Meknès**.
- **Harboul, K.,** Hammani, K., El Karkouri, A. Characterization, Biological Treatment and Phytotoxicity Evaluation of Tanneries Effluents. Fourth Edition of the International Virtual Congress on Water and Environment Studies "CI3E'2021". **15-17 Décembre 2021 à la Faculté des Sciences Dhar El Mehrez de Fès**.
- **Harboul, K.,** Hammani, K., El Karkouri, A. Bioremediation of Hexavalent Chromium by Metallo-Resistant Bacteria". 3ème Congrès International Biotechnologie au service de la Santé "Biotech 2020". **27-29 Février 2020 à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès**.

- **Harboul, K.,** Hammani, K., El Karkouri, A. Hexavalent Chromium Reduction by Bacterial from Abandoned Mine Soil. Deuxième Edition du Congrès International des Etudes sur l'Eau et l'Environnement "CI3E 2019". **14-15 2019 à la Faculté Polydisciplinaire de Nador**.
- **Harboul, K.,** Hammani, K., El Karkouri, A. Déchromatation d'un Effluent des Tanneries par un Consortium Bactérien. 2ème Journée Scientifiques didiée aux doctorant(e)s sous le thème « Biotechnologie, Santé et Environnement ». **10-11 Octobre 2018 à la Faculté des Sciences Dhar El Mehrez de Fès**. **2ème prix de meilleure communication orale**.
- **Harboul, K.,** Chtibi, H., Khattabi, D., Hammani, K., El Karkouri, A. Biological Treatment of Tannery Wastewater. Second Edition International Symposium Science and Technology at the service of the Environment "ISSTE 2018". **23-24 Juin 2018 à la Faculté des Sciences de Tétouan**.
- Chtibi, H., **Harboul, K.,** Khattabi, D., Hammani, K., El Karkouri, A. Second Edition International Symposium Science and Technology at the service of the Environment "ISSTE 2018". **23-24 Juin 2018 à la Faculté des Sciences de Tétouan**.

Introduction générale

Les métaux lourds sont des polluants qu'on peut trouver dans les eaux usées industrielles, peuvent affecter la santé humaine et l'environnement et par conséquent potentiellement mortels (Nakkeeran et al., 2018 ; Lian et al., 2019 ; Gupta et al., 2020). Le chrome (Cr) est considéré comme l'un des métaux lourds les plus toxiques qu'est largement utilisé dans les procédés industriels. Il peut provenir de sources naturelles, principalement de la croûte terrestre, de la décomposition des plantes, des détritus animaux, de la fumée des incendies de forêt et des embruns océaniques (McCartor and Becker, 2010), ou de sources anthropiques telles que l'industrie métallurgique et sidérurgique, les engrais et les pesticides, les incinérateurs et les cendres des déchets, les déchets médicaux et les produits de traitement phytosanitaire et autres (Dermont et al., 2010 ; Stambulska et al., 2018).

Le chrome trivalent (Cr(III)) est considéré comme un élément vital pour les êtres vivants, y compris les humains ; par la suite, son absence ou son excès affectera considérablement leur métabolisme (Rojas-Romero et al., 2015). Cependant, le chrome hexavalent (Cr(VI)) est une forme très soluble, mobile et hautement toxique qui a des effets plus dommageables et dévastateurs sur les animaux, les végétaux et les humains que la forme trivalente (Nakkeeran et al., 2018 ; Jiang et al., 2019). La majorité des rejets environnementaux riches en chrome proviennent de sources industrielles, en particulier de la fabrication de produits chimiques, de tannage du cuir, de minéraux, d'acier, de teinture, de textiles, de travaux métallurgiques, de galvanoplastie et de la production de ciment (Nakkeeran et al., 2018 ; Lian et al., 2019). Ces industries créent une énorme quantité d'eaux usées, y compris des boues solides et des déchets contenant du Cr(VI) et d'autres polluants organiques et inorganiques, tels que les effluents de tanneries qui causent une grave pollution métallique de la faune et de la flore (Yoshinaga et al., 2018).

Les industries du tannage sont l'un des secteurs économiques les plus développés dans de nombreux pays en développement. Malheureusement, ceux-ci sont également la principale source de la pollution de l'environnement en raison de la libération d'énorme volume des effluents potentiellement toxiques et dangereux, ce qui crée une image négative de cette industrie dans la société. Les eaux usées rejetées par les tanneries se caractérisent par une couleur bleu ou brune foncée, une odeur désagréable, un pH élevé, des matières organiques, des solides dissous, du chrome, du sulfate, du phosphate, du nitrate et une variété de métaux lourds et de produits chimiques hautement toxiques (Haydar and Aziz, 2009 ; Chandra et al., 2011 ; Suganthi et al., 2013). Ces produits ne sont pas entièrement absorbés par les peaux lors

du traitement du cuir et se retrouvent donc dans les effluents de tanneries, qui sont une source majeure de la pollution environnementale et de graves menaces pour la santé des êtres vivants (Lofrano et al., 2013 ; Dixit et al., 2015 ; Saxena et al., 2016).

La détoxification du Cr(VI) par un système biologique « ***bioremédiation*** », est considérée comme une stratégie prometteuse et respectueuse de l'environnement pour la remédiation des sites contaminés par le Cr(VI) en raison de son caractère économique, efficace et écologique. Diverses bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif ont été isolées et ont montré des pouvoirs significatifs de réduction du Cr(VI) dans les sols et les effluents contaminés, y compris *Pannonibacter* sp. (Xu et al., 2011), *Bacillus* sp. (Shim et al., 2016), *Achromobacter* sp. (Rao et al., 2017) et *Pseudomonas* sp. (An et al., 2020), … etc. Ces souches utilisent différents mécanismes pour éliminer le Cr(VI), mais avec des efficacités de réduction différentes. Par exemple, les flavoprotéines cytoplasmiques ChrR et YieF ont été trouvées chez *P. putida* et *E. coli*, respectivement, pour médier la réduction aérobie du Cr(VI) en Cr(III) (Park et al., 2002 ; Ackerley et al., 2004). Les réductases liées à la membrane telles que les hydrogénases et les cytochromes utilisent le chromate comme récepteur d'électrons terminal pour obtenir une réduction anaérobie du Cr(VI) (Thatoi et al., 2014). Ces variations des mécanismes d'élimination du Cr(VI) entre les espèces bactériennes sont largement influencées par les paramètres environnementaux (Banerjee et al., 2019).

Dans le traitement des effluents industriels, les bactéries ont montré des caractéristiques plus attractives par rapport aux levures et aux champignons ; en termes d'adaptation, de croissance rapide dans diverses conditions environnementales (pH, température, toxicité du métal, etc.), réduction de grandes quantités du Cr(VI) à courte durée. Outre, la capacité remarquable de certaines bactéries à favoriser la production de phytohormones et de régulateurs de croissance par les plantes (acide gibbérellique, acide abscissique, etc.) qui sont à leur tour d'une grande importance dans les processus de phytoremédiation, on parle des PGPR « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (Khan, 2005 ; Singh et al., 2016 ; Tan et al., 2020).

L'objectif ultime du présent travail est de répondre à cette problématique environnementale en apportant des indices utiles pour la bioremédiation, au moyen des bactéries, des effluents de tanneries contaminés par le chrome et d'autres polluants grâce au décryptage des mécanismes d'élimination du Cr(VI) et la valorisation de ces effluents traités par l'irrigation des plantes.

Nos objectifs ont été définis comme suit :

- Caractérisation physico-chimique des échantillons des sols miniers.
- Isolement et criblage de bactéries résistantes au chrome et aux métaux lourds.
- Mise en évidence de quelques activités enzymatiques des isolats bactériens isolés à partir des échantillons des sols miniers.
- Identification moléculaire (PCR et Séquençage) des isolats bactériens.
- Évaluation de la capacité de ces bactéries performantes à détoxifier le Cr(VI) dans différentes conditions : pH, température, concentration de Cr(VI), présence d'autres métaux, présence des accepteurs et des donneurs d'électrons ainsi que des inhibiteurs des protéines et du métabolisme cellulaire.
- Comparaison de la capacité des bactéries à éliminer le Cr(VI) dans différents états, à la fois libres et immobilisées, avec réduction des contaminations répétées du Cr(VI) par les cellules dans des milieux renouvelés et non renouvelés.
- Détermination des mécanismes d'élimination du Cr(VI) par :
    - Étude de l'adsorption du Cr(VI) au niveau de la paroi bactérienne.
    - Modélisation des isothermes d'adsorption.
    - Analyse des cellules par MEB-EDX.
    - Détermination du rôle des groupements fonctionnels à la surface cellulaire dans la biosorption et la bioréduction du Cr(VI).
    - Étude de la réduction du Cr(VI) par les cellules au repos, perméabilisées et les fractions subcellulaires, tout en déterminant la nature, la localisation et le poids moléculaire de la chromate réductase.
- Caractérisation physico-chimique et traitement des effluents de tanneries par les cellules bactériennes performantes séparées et en consortium.
- Valorisation des effluents de tanneries par irrigation des plantes avec évaluation de certains paramètres de croissance, physiologiques, biochimiques et accumulation des métaux.

Le présent manuscrit est subdivisé en quatre parties :

i). La première partie est consacrée à l'étude bibliographique. Elle présente des généralités sur la pollution des ressources en eau dans le monde en général et au Maroc en particulier. Après, elle donne un aperçu sur le chrome dans l'environnement, son transport et sa toxicité, suivie des stratégies de remédiation du Cr(VI) notamment la bioremédiation au moyen des

microorganismes. Ensuite, les mécanismes impliqués dans la résistance et la réduction du Cr(VI). En fin, l'utilisation ou la valorisation des effluents de tanneries traités.

ii). La deuxième partie est portée sur les techniques expérimentales, les méthodes analytiques et les analyses statistiques utilisés.

iii). La troisième partie présente les résultats obtenus et leurs discussions pour répondre aux problématiques soulevés.

iv). La quatrième partie est une conclusion générale avec des perspectives qui ouvre la porte à d'autres volets de recherches.

Etude bibliographique

I. Généralités sur la pollution métallique des ressources hydriques

1. Eléments traces métalliques

Les métaux lourds sont l'une des principales sources de pollution de l'eau, du sol et de l'air, dont l'augmentation des niveaux de ces polluants dans l'environnement est préoccupante. Les métaux dits lourds dont la dénomination a évolué vers la notion d'éléments traces métalliques (ETM) sont au nombre de cinquante-trois (Duffus, 2009). Ils sont définis comme les éléments métalliques naturels, métalloïdes ou métaux, ayant une masse volumique supérieur à 5 g/cm^3 et sont généralement associés à une toxicité (Nies, 1999) (**Figure 1**). Les métaux tels que le cuivre, le sélénium et le zinc sont essentiels en tant qu'oligo-éléments au métabolisme du corps humain, même s'ils sont toxiques à des concentrations plus élevées. D'autres métaux tels que le mercure, le cadmium et le plomb ont des effets toxiques directs sur tous les êtres vivants (Fergusson, 1990).

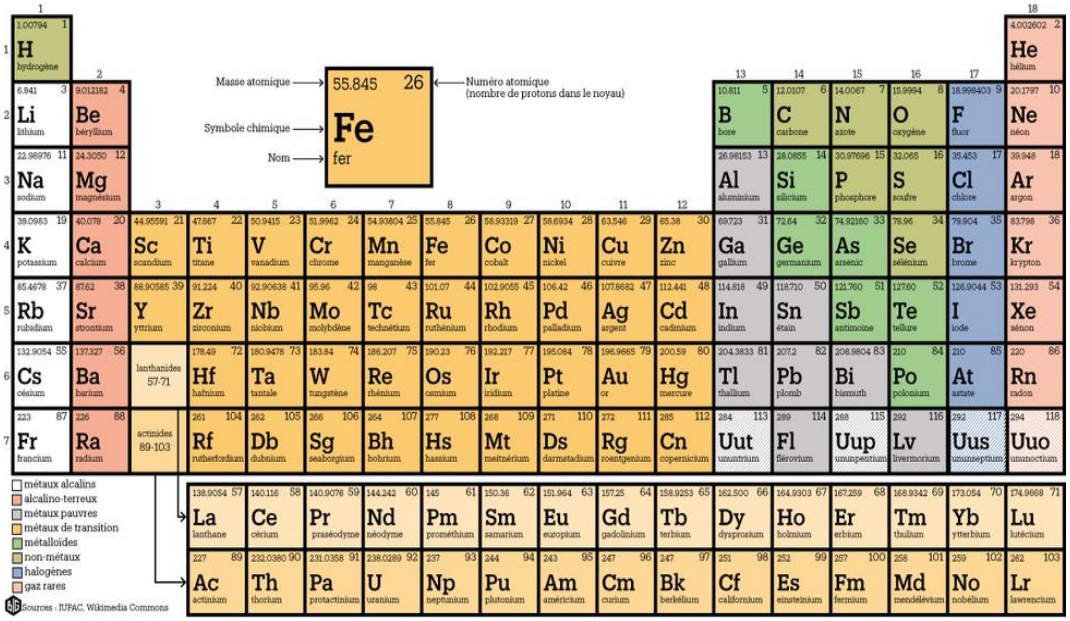


Figure 1 : Tableau de Mendeleïev (Bauvais, 2015).

Les métaux lourds restent dans l'environnement, changeant son état chimique et s'accumulant dans la chaîne alimentaire. Cette pollution métallique à ses racines dans les activités telles que les industries minières, de raffinage, de tannage et de galvanoplastie. Ces activités libèrent des effluents et augmentent la variété de métaux lourds comme le chrome, le cadmium, le cuivre, le nickel, le plomb et le zinc dans l'environnement. La solubilité élevée dans l'eau, la mobilité, la récalcitrance à la dégradation et la persistance conséquente de ces métaux lourds font que leur concentration finit par augmenter jusqu'à l'état d'effets toxiques. Il est important

de noter cependant que les concentrations de métaux individuels dans les tissus vivants doivent être maintenues très basses et doivent être gardé dans des limites étroites pour permettre la performance biologique optimale de la plupart des organismes (Misra and Mani, 2009). Les métaux lourds ne sont pas biodégradables et une fois qu'ils entrent dans un environnement, ils y restent longtemps (Voet et al., 2000), ils sont considérés comme des polluants graves en raison de leur forte toxicité, de leur persistance et de leurs caractères non biodégradables, constituant ainsi une menace pour les êtres humains et d'autres formes de vie biologique (Adeleken and Abegunde, 2011).

2. Pollution métallique à l'échelle internationale

La contamination des eaux douces par un large éventail de polluants est devenue un sujet de grande préoccupation au cours des dernières décennies. Les systèmes aquatiques reçoivent une grande quantité de métaux lourds provenant de processus naturels et d'activités anthropiques (Wogu and Okaka, 2011). Ces dernières provenant des activités humaines telles que les effluents industriels, ainsi que le ruissellement sont les principales sources de métaux dans les ressources en eaux (Sonayei et al., 2009). Le rejet de métaux lourds dans les rivières ou tout autre milieu aquatique peut modifier à la fois la diversité des espèces aquatiques et les écosystèmes en raison de leur toxicité et de leur comportement cumulatif (Al-Weher, 2008). Les métaux lourds dissous dans l'eau mettent également en danger la vie du public qui l'utilise pour boire mais aussi pour l'irrigation. Lorsqu'ils sont utilisés pour l'irrigation sans aucun traitement préalable, les métaux lourds risquent d'être incorporés dans la chaîne alimentaire et donc ingérés par l'homme et les animaux (Wogu and Okaka, 2011). Les métaux lourds s'accumulent dans les sols à des niveaux toxiques en raison de l'application à long terme d'eaux usées non traitées et par conséquent, les sols irrigués par les eaux usées accumulent des métaux lourds à la surface. Lorsque la capacité du sol à retenir les métaux lourds est réduite en raison de l'application répétée, les métaux s'infiltrent dans les eaux souterraines (Salano, 2013).

En Inde, il existe plus de 300 industries de fermentation de mélasse de canne à sucre générant environ $3{,}5 \times 10^{15}$ litres d'effluents par an (Chandra et al., 2004a) et il existe environ 3 000 tanneries avec une capacité de traitement annuelle de 70 000 tonnes de cuirs et peaux (Srivastava et al., 2001), qui sont la principale source de pollution par le chrome dans l'environnement. Les eaux usées rejetées par les industries de tannage ont des concentrations très élevées de demande biologique en oxygène (DBO), de demande chimique en oxygène

(DCO), de composés phénoliques, de sulfates, de phosphates et de métaux (Chandra et al., 2004b).

Le tannage du cuir est un processus complexe pour transformer la peau brute d'un animal en un produit final en cuir stable (Stoop, 2003). Une énorme quantité d'eaux usées (environ 80 m^3/tonne) est également générée lors du tannage du cuir à partir de la matière première (Joyia et al., 2021). Selon une estimation, plus de 600 tanneries des grandes villes du Pakistan rejettent des eaux usées non traitées dans les égouts locaux qui, à leur tour, sont fréquemment utilisés pour irriguer les champs agricoles (Afzal et al., 2014 ; Abid et al., 2019). Il y a quelques années, dans certaines villes italiennes, les niveaux de chrome étaient déjà aux limites de la directive 2001/83/CE sur la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Cela a conduit l'Italie à notifier à la Commission Européenne la nécessité de modifier les paramètres du chrome hexavalent dans l'eau potable, ainsi qu'à introduire une limite de 10 mg/L pour le Cr(VI) dans l'eau potable dans la législation actuelle. En plus, l'Italie annonce que la détection de concentrations de chrome supérieures à la limite légale impliquera des enquêtes sur la source d'eau.

Outre l'Italie, d'autres pays de l'Union Européen (UE), comme la Grèce, s'inquiètent des niveaux élevés de chrome hexavalent dans les eaux, qui dépassent fréquemment la limite autorisée pour la consommation humaine (Tziritis et al., 2012 ; Almeida et al., 2019). En ce qui concerne le seuil de chrome pour l'eau potable, bien que la plupart des pays de l'Union Européen appliquent une limite légale de 50 mg/L de chrome, les limites vont être réduites à 25 mg/L, selon une refonte de la directive 2001/83/Commission Européen, qui s'est produit en 2018 (Almeida et al., 2019).

En effet, Cette industrie est considérée comme une source majeure de pollution des sols agricoles recevant ces effluents, puisqu'elle provoque l'inhibition de la germination des graines et l'épuisement de la végétation en réduisant l'alcalinité du sol et la disponibilité du manganèse dans les terres (Kumar and Chandra, 2004). En milieu aquatique, il réduit le pouvoir pénétrant de la lumière solaire et donc réduit les activités photosynthétiques et le taux d'oxygène dissous (Pant et al., 2007).

En plus, on estime qu'au moins 1,6 million de vies sont perdues chaque année en raison du manque d'accès à l'assainissement et à l'eau potable (Farmer, 2002) et que des millions de personnes souffrent de maladies chroniques à cause de l'eau polluée qu'elles doivent boire (Hill, 2010). Le **tableau 1** montre le niveau admissible de certains métaux toxiques dans l'eau douce. Ces normes sont préparées et recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Tableau 1 : Normes de l'OMS pour l'eau douce (Bala et al., 2008).

Métal	Concentration maximale admissible (µg/L)	Niveau maximal ou toxique de métal (µg/L)
Cd	5	10
Cr	50	100
Pb	50	100
Cu	50	15 000
Zn	5 000	15 000

3. Pollution métallique à l'échelle nationale

Les ressources en eau du Maroc connaissent une forte dégradation qui ne cesse de s'accélérer et devient de plus en plus préoccupante en raison de la diminution des précipitations et de l'augmentation des sources de pollution d'origine domestique, industrielle et agricole (Mabrouki et al., 2016 ; Ramani et al., 2017). La pollution causée par la présence de métaux lourds dans les surfaces d'eau est généralement due aux activités minières et industrielles par leurs rejets d'effluents (Jourdan et al., 2005). Certains de ces éléments métalliques sont considérés comme indésirables et toxiques et peuvent présenter des inconvénients organoleptiques pour le consommateur, comme c'est le cas du cuivre, zinc, fer, manganèse et l'aluminium. D'autres éléments tels que le cadmium, le chrome, le mercure et le plomb peuvent être toxiques et présenter de graves risques pour la santé humaine et l'environnement (Hu et al., 2014 ; Corguinha et al., 2015).

Les zones minières de la région de Midelt, la région sud de Marrakech, Ouarzazate et le nord de l'Anti-Atlas, comptent un grand nombre de sites métallifères, dont certains sont exploités tandis que d'autres sont abandonnés. Ces mines sont des piliers fondamentaux de l'économie marocaine et ont largement contribué à la production nationale de métaux. Sans aucune prévision de travaux de réhabilitation, ces sites présentent aujourd'hui une source majeure de contamination par les métaux (El Khalil et al., 2008 ; El Aafi, 2016). Outre l'exploitation minière, les activités industrielles principalement les tanneries, les dinanderies, les raffineries, les industries textiles, mécaniques et électriques contribuent énormément à la pollution métallique des ressources en eau au Maroc (Derwich et al., 2010).

Bien que le Maroc ait promulgué la loi 10-95 sur l'eau qui traite la préservation et la protection des ressources en eau, le traitement, la réutilisation et l'évacuation des eaux usées.

Certaines activités industrielles continueront à rejeter leurs effluents chargés d'éléments métalliques toxiques dans l'environnement sans aucun souci environnemental.

II. Le chrome dans l'environnement

La pollution par les métaux lourds est devenue un problème mondial, avec des niveaux de pollution différents d'un endroit à l'autre. La plupart des métaux lourds comme l'arsenic, le chrome, le cadmium, le plomb et le mercure sont bien connus pour leur toxicité, leur non-biodégradabilité, leur persistance dans la nature et leur tendance à la bioaccumulation (Garg et al., 2007). Parmi ceux-ci, le chrome hexavalent (Cr(VI)) qui a une large gamme d'applications dans les industries de l'acier inoxydable, les tanneries du cuir, les procédés de galvanoplastie et les teintures ainsi que dans les procédés de préservation du bois. L'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (APEEU) a identifié le Cr(VI) comme l'un des dix-sept produits chimiques constituant une menace pour les humains (McCullough et al., 1999). Il pénètre dans les systèmes environnementaux par certains processus naturels ainsi que par des activités anthropiques telles que la production industrielle, l'utilisation domestique et agricole, etc. Les effluents de la plupart des industries sont rejetés directement dans l'environnement sans aucun type de traitement, ce qui conduit à la contamination et à la destruction de l'écosystème. Le **tableau 2** présente la teneur en chrome dans diverses sources d'effluents industriels et rejets d'eaux usées.

Tableau 2 : Teneur en chrome dans diverses sources d'effluents et de rejets industriels.

Rejets des effluents industriels	Teneur en Cr	Références
Effluents de tannerie	**0.7 – 345** mg/L	Dhungana and Yadav (2009)
Effluents des usines textiles	**0.11 – 0.21** mg/L	Bhardwaj et al. (2014)
Déchets de traitement du minerai de chromite	**199 – 3970** mg/Kg	Becker et al. (2006)
Déchets de l'industrie sidérurgique	**2915** mg/Kg	Sas et al. (2015)
Effluents de l'industrie du chromage	**5721.95** mg/L	Karega et al. (2015)

1. Cycle du chrome

Le chrome (Cr) est un métal de transition du groupe VI-B du tableau périodique. Le Cr est naturellement présent dans les roches, les sols, les plantes, les animaux et les émissions volcaniques ; c'est le septième élément le plus abondant sur terre. Les formes les plus stables et les plus abondantes sont les espèces Cr(III) trivalente et Cr(VI) hexavalente. L'oxydation et la réduction simultanées du chrome est le fait le plus remarquable du cycle du chrome. Le Cr(III) est oxydé en Cr(VI) dans les sols et les sédiments spontanément par l'oxyde de manganèse (MnO_2) (**éq. 1**), tandis que la réduction du Cr(VI) en Cr(III) a lieu par divers composés de carbone réduit du sol (**éq. 2**).

$$Cr^{3+} + 1{,}5\ MnO_2 + H_2O \longrightarrow HCrO_4^- + 1{,}5\ Mn^{2+} + H^+ \quad (\textbf{éq. 1})$$

$$C_6H_6O_2 + CrO_4^{2-} + 2\ H_2O \longrightarrow 0{,}5\ Cr_2O_3 + 1{,}5\ C_6H_4O_2 + 2{,}5\ H_2O + 2\ OH^- \quad (\textbf{éq. 2})$$

Les caractéristiques chimiques et physiques du Cr(III) et du Cr(VI) trouvés dans le sol sont relativement opposées, le premier étant moins mobile, assez stable et presque non toxique tandis que le second étant mobile, réactif et toxique. Le Cr(VI) existe naturellement dans l'environnement en raison de l'oxydation du Cr(III). Mais lorsque des concentrations accrues sont rejetées par divers effluents industriels, cela conduit à un excès de Cr(VI) qui est absorbé dans la biosphère et conduit à une grave toxicité (Jobby et al., 2018). La **figure 2** illustre le cycle naturel du chrome dans l'environnement (Dhal et al., 2013).

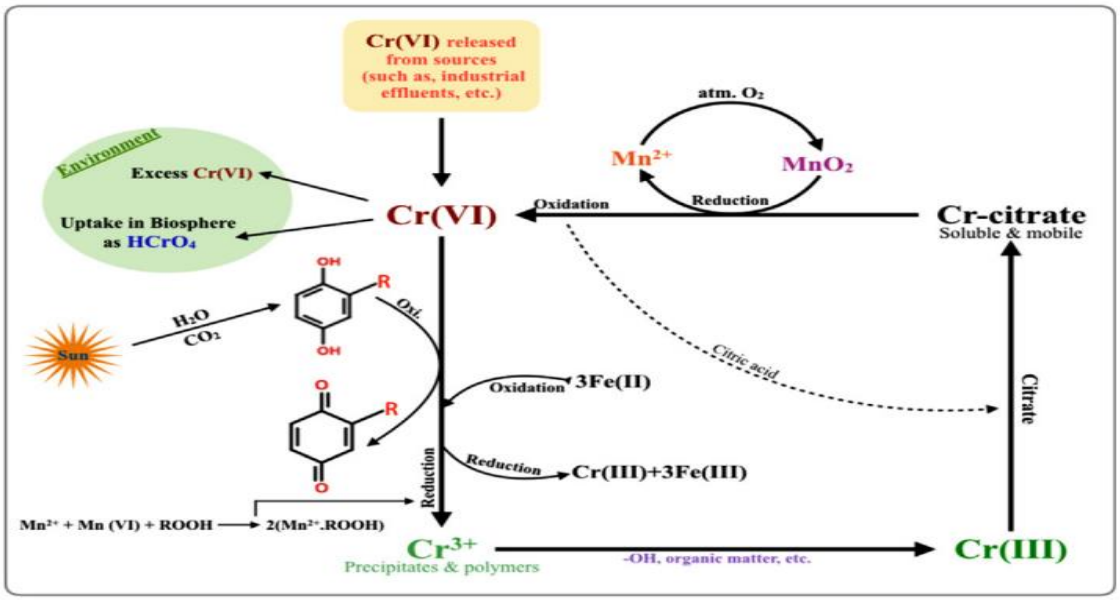


Figure 2 : Cycle du chrome.

2. Spéciation du chrome

Le Cr(VI) est dominant dans les conditions oxydantes tandis que le Cr(III) prédomine dans les conditions réductrices. En solution aqueuse, le Cr(VI) peut former plusieurs espèces, à savoir $Cr_2O_7^{2-}$, CrO_4^{2-}, H_2CrO_4 et $HCrO_4^-$. Cette distribution dépend du pH de la solution, de la concentration en Cr total, de la présence de composés oxydants et réducteurs, du potentiel redox et de la cinétique des réactions redox. Si le pH de la solution est supérieur à 7 (**éq. 3**), le CrO_4^{2-} est le seul ion existant indépendamment de la concentration de Cr(VI). Alors que $HCrO_4$ est l'espèce prédominante dans la plage de pH de 1-6 (**éq. 4**) et (**éq. 5**) (Barrera-Díaz et al., 2012 ; Dhal et al., 2013).

$$HCrO_4^- \longrightarrow H^+ + CrO_4^{2-} \text{ (pH > 7) (éq. 3)}$$

$$H_2CrO_4 \longrightarrow H^+ + HCrO_4^- \text{ (pH ~ 1-6) (éq. 4)}$$

$$2\ HCrO_4^- \longrightarrow Cr_2O_7^{2-} + H_2O \text{ (éq. 5)}$$

Étant donné que le Cr(VI) est plus soluble que le Cr(III), le premier a une grande mobilité dans l'eau et le sol, ce qui rend l'absorption par les cellules procaryotes et eucaryotes plus faisable.

3. Transport du chrome

Le chrome est transporté dans l'environnement principalement par l'altération de la roche, les retombées atmosphériques et les précipitations humides et sèches (Sneddon, 2012). La concentration de Cr dans l'environnement est également connue pour augmenter en raison des activités humaines. Le chrome est largement utilisé dans diverses applications industrielles telles que le traitement de production de métaux, de chrome, de cuir, de textile, de chromage, de soudage d'acier inoxydable et de pigment ferrochrome (Bielicka et al., 2005). Plusieurs industriels utilisent des composés de chrome sous diverses formes, qui sont présentés dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Forme de chrome utilisé dans diverses industries (Das and Mishra, 2009).

Chrome utilisé dans les industries	Formulaire de produits chimiques
- Tannage de produits en cuir - Produits de préservation du bois et acier inoxydable	$[(NH_4)_2Cr_2O_7]$, (CrO_3), $(KCrO_4)$, $(CrNa_2O_4)$, $[(NH_4)_2Cr_2O_7]$, $(K_2Cr_2O_7)$
- Agent anti-corrosion	$(BaCrO_4)$, $(CaCrO_4)$, $(ZnCrO_4)$, $(SrCrO_4)$, $(CrNaO_4)$
- Peintures, encres et plastiques, pigments	$(BaCrO_4)$, $(CaCrO_4)$, $(PbCrO_4)$, $(ZnCrO_4)$, $(K_2Cr_2O_7)$, $(CrNa_2O_4)$

4. Toxicité du chrome

L'imperméabilité de la membrane cellulaire aux complexes du Cr(III) le rend environ 10-100 fois moins toxique que le Cr(VI). Le Cr(III) joue un rôle important dans le maintien de la glycémie en facilitant la liaison de l'insuline aux récepteurs de surface cellulaire, aussi bien dans la diminution des taux de graisse corporelle, de cholestérol et de triglycérides et dans l'augmentation de la masse musculaire (Pechova and Pavlata, 2007). Cependant, le Cr(III) intracellulaire résultant de la réduction du Cr(VI), forme des complexes acides aminés nucléotidiques dont le potentiel mutagène n'est pas entièrement connu (Roundhill and Koch, 2002).

Les résidus de chrome ont tendance à être amplifiés le long de la chaîne alimentaire (Renzoni et al., 1998 ; Driscoll et al., 2013). Bien que le Cr(VI) soit considéré comme cent fois plus toxique que le Cr(III) (Zhou et al., 2017a), le chrome total et ses composés ont été classés cancérigènes pour l'homme. Le Cr(VI) provoque des irritations et des ulcères dans l'estomac et l'intestin grêle, des dommages aux reins et au foie, au sperme et au système reproducteur masculin (ATSDR, 2012). En outre, il peut causer des problèmes respiratoires, notamment une irritation de la muqueuse du nez, un écoulement nasal et d'autres problèmes respiratoires. Le chrome peut aussi entraîner le cancer du poumon, de l'estomac et du tractus intestinal. De plus, Kornhauser et al. (2002) ont signalé des effets indésirables du métabolisme du fer chez les travailleurs de la tannerie, dus à une accumulation excessive du chrome dans l'organisme. Le **tableau 4** présente les propriétés et les effets du Cr(VI) sur l'Homme.

Tableau 4 : Propriétés et effets du Cr(VI) sur les humains (Barnhart, 1997 ; Dayan and Paine, 2001 ; Martin and Griswold, 2009 ; Briffa et al., 2020).

Propriétés	◦ Densité : 7,15 g/cm^3 ◦ 21 élément le plus abondant à la surface de la Terre ◦ Métal assez actif ◦ Réagit avec la plupart des acides ◦ Forme une couche d'oxyde de chrome (III) rendant le métal moins corrosif
Effets sur les humains	• L'ingestion orale de chrome (VI) provoque généralement une intoxication aiguë et divers symptômes, notamment : ◦ ulcération gastro-intestinale, ◦ nausées et vomissements, ◦ fièvre, ◦ diarrhée, ◦ néphrite toxique, ◦ lésions hépatiques, ◦ coma ◦ mort (habituellement à 1-3 g) • L'inhalation de chrome (VI) ou un contact répété avec la peau provoque une intoxication chronique. Le chrome (VI) peut provoquer : ◦ dermatite allergique de contact et eczéma, ◦ gingivite, ◦ irritation des muqueuses, ◦ bronchite et pneumonie, ◦ maladie du foie et des reins, ◦ sinusite, ◦ cancer du poumon

Une forte dose de Cr(VI) peut entraîner la mort chez les animaux et les humains. Chez le rat, la DL_{50} pour la toxicité orale s'est avérée comprise entre 50-100 mg/Kg pour le Cr(VI) et 1 900-3000 mg/Kg pour le Cr(III) (De Flora et al., 1990). Les procaryotes sont connus pour être plus résistants au Cr(VI) que les eucaryotes (Kamaludeen et al., 2003). Le mécanisme principal de la toxicité du Cr(VI) chez les procaryotes ainsi que chez les eucaryotes est lié à sa diffusion facile à travers la membrane cellulaire, suivie de la réduction du Cr(VI) dans les cellules donnant lieu à des radicaux libres qui peuvent directement provoquer des altérations de l'ADN et d'autres substances toxiques (Arslan et al., 1987 ; Kadiiska et al., 1994 ; Liu et al., 1995).

Le Cr(VI) est également associé à une diminution de l'absorption des nutriments et de la photosynthèse, ce qui entraîne une croissance lente des plantes. Il affecte sévèrement plusieurs processus physiologiques, morphologiques, biochimiques et induit la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules végétales (**Figure 3**). La toxicité du chrome est indiquée sous forme de chlorose et de nécrose chez les plantes (Shahid et al., 2017). De plus, sa tendance à se bioaccumuler dans les tissus vivants lorsqu'il se déplace dans une chaîne alimentaire augmente le niveau d'inquiétude quant à son élimination des sites pollués (Volesky, 1990).

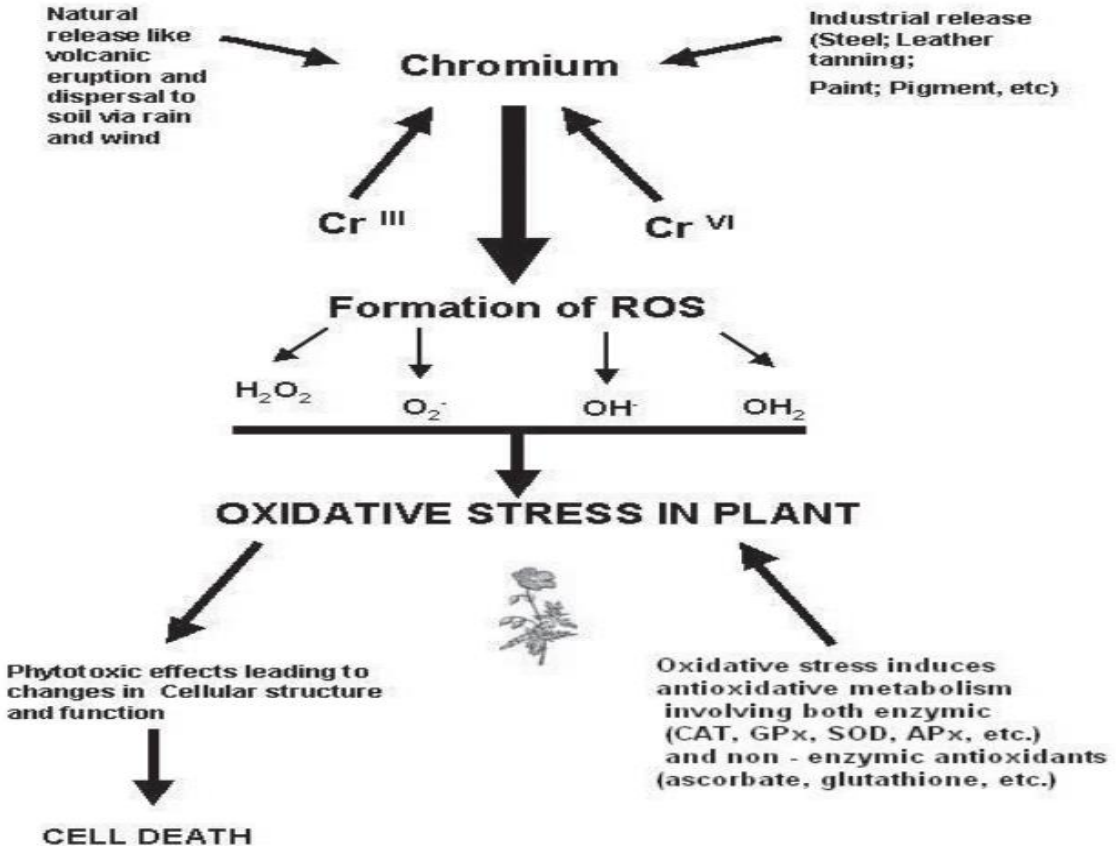


Figure 3 : Différentes sources de chrome et leur implication dans l'induction du stress oxydatif chez les plantes (Panda and Choudhury, 2005).

III. Procédés de remédiation des environnements pollués par le Cr(VI)

1. Méthodes physico-chimiques

Le Cr(VI) peut être éliminé par différents procédés physico-chimiques. Les développements récents dans la compréhension de diverses méthodes telles que :

- Le traitement thermique (Meegoda et al., 2017),
- Le dessalement (An et al., 2014),
- La réduction directe (Yuan et al., 2016),
- L'adsorption sur résine (Choppala et al., 2018),
- L'électrolyse (He et al., 2014),
- L'électrocoagulation (Masoumbeigi and Rezaee, 2015),
- L'adsorption sur charbon actif (Yang et al., 2015),
- L'adsorption céramique composite (Lee and Yoo, 2016),
- L'adsorption sur nano-fibres de carbone (Gopalakrishnan et al., 2015),
- La réduction catalysée par nanomatériaux (Celebi et al., 2016)
- La réduction catalytique (Fan et al., 2016).

Les processus conventionnels sont complexes en raison des différents sous-processus intensifs, de l'utilisation de grandes quantités de produits chimiques et de la génération de boues toxiques (Malaviya and Singh, 2016). Par exemple, la réduction carbothermique du Cr(VI) a été réalisée en ajoutant du carbone à une très haute température allant de 1000 à 1400°C avec limitation de la taille des particules de l'échantillon de sol contaminé au Cr(VI). Pour obtenir une réduction complète, 15 % de carbone ont été ajoutés au sol, cependant, l'évaluation des émissions de CO_2 a été ignorée pendant le processus (Rama Devi et al., 2021).

De même, dans les autres méthodes conventionnelles, des environnements chimiques rigoureux ont été employés dans les réacteurs conçus de manière complexe pour réduire/adsorber le Cr(VI). La synthèse de différents nanomatériaux, fibres de carbone, composites, résines coûteuses a été utilisée dans les méthodes conventionnelles rendant le processus plus compliqué en termes d'évaluation des coûts et de respect de l'environnement (An et al., 2014 ; Mishra and Verma, 2016). La **figure 4** montre la représentation schématique de diverses méthodes physiques d'élimination du chrome des eaux usées.

La réduction in situ du Cr(VI) des eaux usées ne favorise pas le procédé conventionnel car il comporte de multiples étapes pour mettre en place l'opération à l'échelle pilote. Lors de l'examen de tous les inconvénients des méthodes conventionnelles, l'accent a été mis sur de meilleures méthodes de traitement alternatives. La détoxification biologique du Cr(VI) en Cr(III), relativement moins toxique et moins mobile, est susceptible d'être un processus utile pour l'assainissement des eaux et des sols contaminés par rapport aux processus physico-chimiques (Lovley, 1993 ; Lovley, 1995).

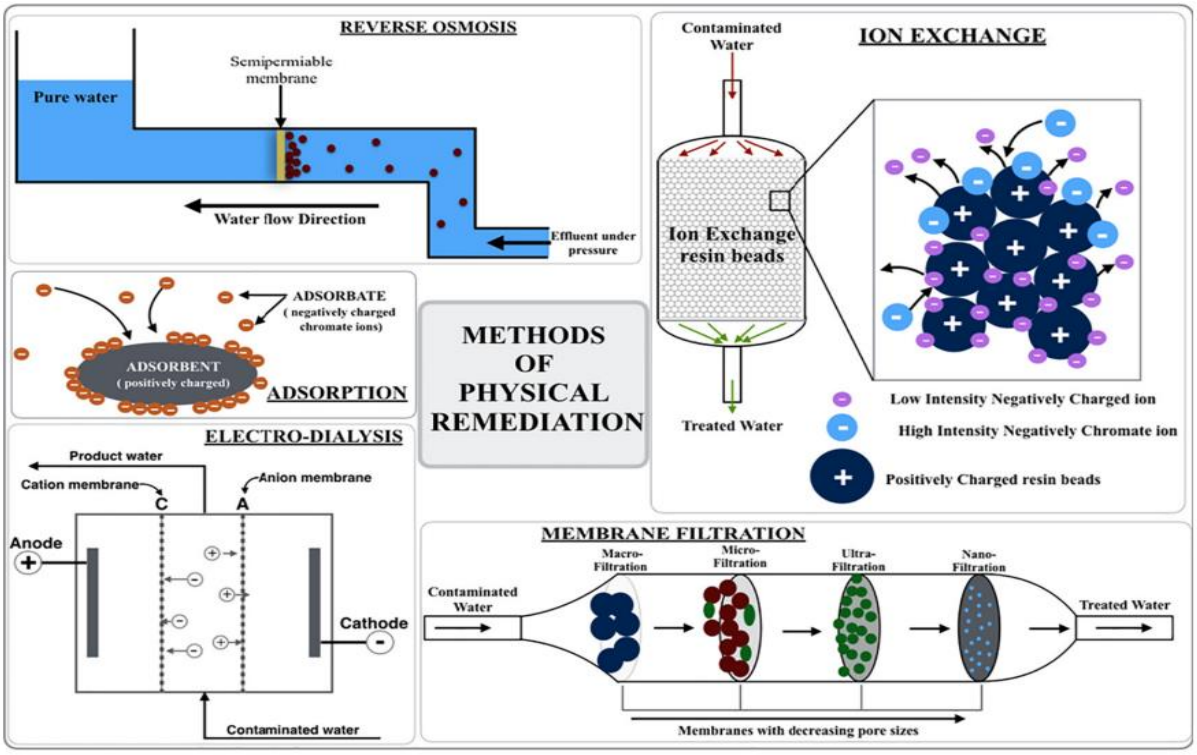


Figure 4 : Représentation schématique de diverses méthodes d'assainissement physique du chrome des eaux usées (Jobby et al., 2018).

2. Méthodes biologiques

La transformation de polluants nocifs en composés non toxiques par l'implication d'organismes vivants est appelée traitement biologique (bioremédiation, phytoremédiation, phycoremédiation…) (Asha Latha and Sandeep Reddy, 2013). Grâce à cette détoxification, un site contaminé par des métaux lourds peut être ramené à son état d'origine sans créer d'effet nocif sur l'environnement (Adhikari et al., 2004). Les organismes vivants, y compris les bactéries, les champignons, les levures, les algues et les plantes, ont montré des capacités d'assainissement, mais principalement les bactéries et les champignons se sont révélés plus efficaces dans ce processus. Les faibles besoins en énergie, les faibles coûts d'exploitation,

l'absence de risques pour l'environnement et la santé, le rendement élevé, la possibilité de réutilisation et de récupération des métaux sont quelques-uns des avantages associés à ces méthodes (Garbisu and Alkorta, 2003).

Les microorganismes utilisent souvent le métal comme nutriment ou source d'énergie pour répondre à leurs besoins de croissance (Tang et al., 2007). Ils métabolisent ces produits chimiques par une voie caractéristique catalysée par des enzymes et les transforment en composés inoffensifs, plus souvent du CO_2 ou du CH_4, de l'eau et de la biomasse (Vidali, 2001). Les paramètres importants qui affectent le succès du processus de médiation biologique sont : la nature chimique des polluants, la teneur en humidité, la structure, l'état nutritionnel, l'hydrogéologie, la température, le pH du milieu et la communauté microbienne du site contaminé (Asha Latha and Sandeep Reddy, 2013).

2.1. Phytoremédiation

La détoxification des environnements pollués par les métaux lourds au moyen des plantes est définie comme la phytoremédiation. Cette stratégie a bien prouvé son efficacité lorsque les technologies d'ingénierie conventionnelles sont plus coûteuses (Oliveira, 2012 ; Ranieri et al., 2020). La phytoremédiation est une approche respectueuse de la nature et esthétique pour nettoyer les eaux contaminées, les sols et les sites pollués par les métaux lourds et qui combinent les espèces végétales terrestres et aquatiques (Yadav et al., 2018). Plusieurs études et essais sur le terrain ont prouvé que la phytoremédiation était une technologie prometteuse et rentable pour l'élimination du Cr(VI) des sites pollués (Ali et al., 2013). Malgré la toxicité connue du Cr(VI) pour les organismes vivants, certaines plantes montrent une résistance incroyable à des concentrations élevées et poussent très bien dans un environnement contaminé (Tangahu et al., 2011 ; Ali et al., 2013).

En effet, le processus de phytoremédiation est plus difficile qu'il n'y paraît car le choix d'une espèce végétale pour un environnement particulier est le facteur le plus important et peut être difficile. Il existe six types de base différents de sous-ensembles de phytoremédiation : (**i**) la phytoaccumulation, (**ii**) la phytodégradation, (**iii**) la phytovolatilisation, (**iv**) la phytostabilisation, (**v**) la rhizodégradation et (**vi**) la rhizofiltration (**Figure 5**).

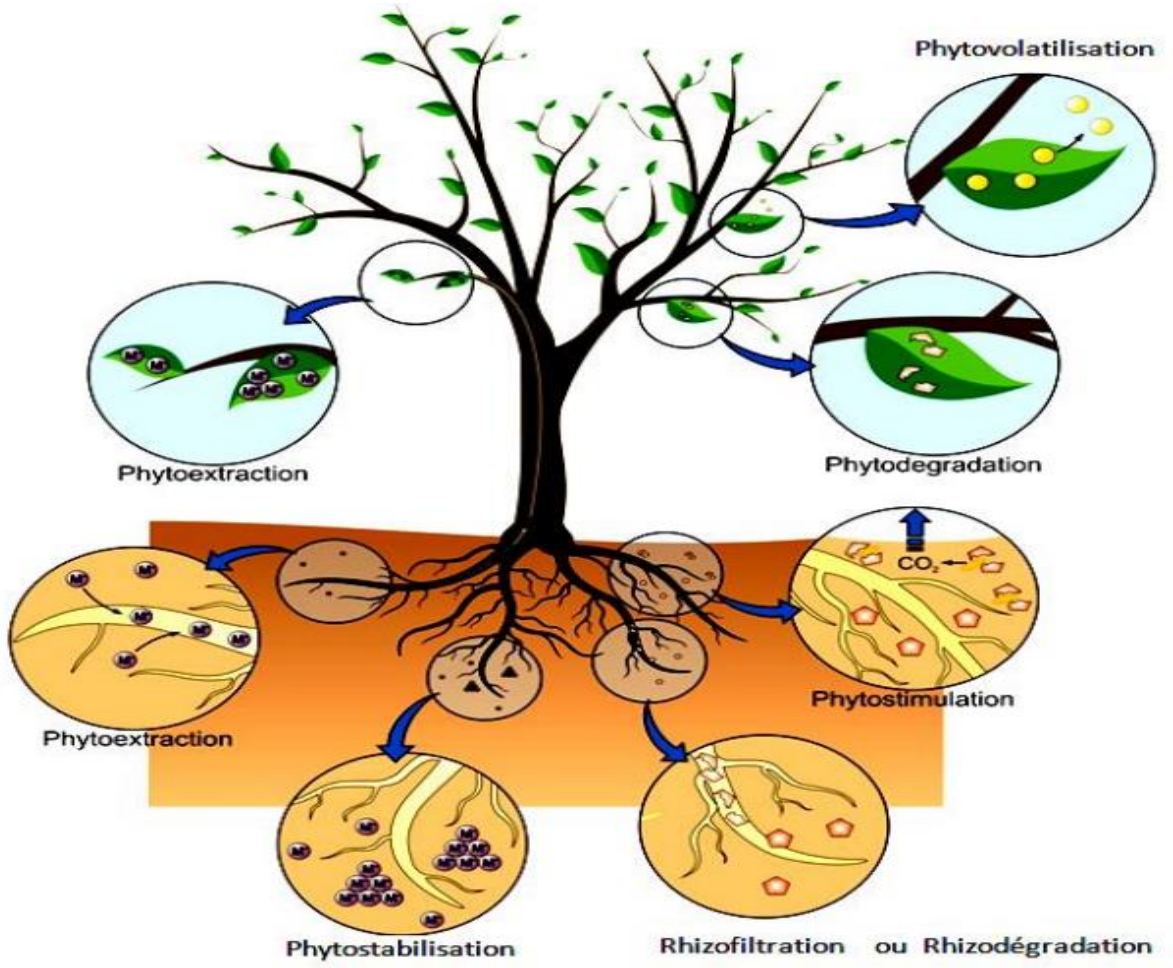


Figure 5 : Représentation schématique des différentes stratégies de phytoremédiation (Favas et al., 2014).

2.2. Bioremédiation

La bioremédiation est une technologie médiée par des microorganismes (principalement des bactéries et des champignons), est considérée comme une approche potentielle, économique et respectueuse de l'environnement pour la réduction ou la stabilisation sur site des polluants (Dhal et al., 2013). Basée sur l'exploitation du pouvoir dépolluant de certains microorganismes endogènes ou exogènes des sites contaminés, la bioremédiation peut être subdivisée en plusieurs catégories selon la méthode de dépollution ou le principe biologique mis en œuvre. Certaines catégories sont listées ci-dessous (Ballerini et al., 1998 ; ADEME, 2006).

a. Bioatténuation

C'est la forme la plus simple de bioremédiation puisqu'elle est basée sur l'aptitude naturelle des microorganismes en place à agir sur les polluants sans aucune intervention humaine hormis le suivi analytique de la dépollution. Cette technique suppose que la microflore native d'un site pollué a su s'adapter à la pollution en question et peut utiliser les contaminants comme nutriments. La communauté microbienne capable d'utiliser ces polluants prolifère et peut alors devenir dominante (Mulligan and Yong, 2004). La bioatténuation agit sur la mobilité, la concentration du métal et sa toxicité dans le sol ou l'eau contaminée. Cette technique est néanmoins appliquée à un nombre limité des environnements en raison des délais de dépollution, qui peuvent parfois atteindre plusieurs décennies et de la surveillance permanente nécessaire (Heitzer and Sayler, 1993).

b. Biostimulation

La modification de l'environnement pour stimuler la croissance des microorganismes existants pendant la bioremédiation est appelée biostimulation. Cela nécessite l'ajout de divers nutriments et accepteurs ou donneurs d'électrons. La réduction microbienne du Cr(VI) peut être améliorée par l'ajout de sources de carbone tels que le glucose, l'acétate, le lactate ou la mélasse (Brodie et al., 2011). L'efficacité des différents donneurs d'électrons dans la biostimulation dépend des communautés microbiennes indigènes et des caractéristiques physico-chimiques de chaque site. Cela joue un rôle important dans la cinétique de la croissance microbienne et la réduction des métaux lourds dans des environnements spécifiques (Varadharajan et al., 2015).

c. Bioaugmentation

Cette technique existe depuis de nombreux siècles dans l'agriculture mais elle a été introduite il y a une vingtaine d'années dans la bioremédiation des environnements pollués. Elle consiste en l'introduction dans le site contaminé de microorganismes allochtones, sélectionnés (exogènes adaptés aux polluants à traiter), capables de dégrader les contaminants présents. Il améliore les performances de la communauté microbienne native et agit également sur la spéciation des polluants inorganiques (Trindade et al., 2002 ; Tyagi et al., 2011). Les microorganismes utilisés peuvent provenir de sélections effectuées à partir d'échantillons de sols, sédiments, boues ou effluents. Elles sont ensuite cultivées en masse et inoculées dans leur milieu d'origine ou dans un autre milieu contaminé. Avec les outils génétiques et

moléculaires actuels, des microorganismes génétiquement modifiés peuvent être utilisés à cette fin, mais leur introduction dans l'environnement doit faire l'objet de contrôles poussés (Sayler and Ripp, 2000).

IV. Remédiation biologique du Cr(VI)

La détoxification biologique du Cr(VI) en Cr(III) est susceptible d'être un processus utile pour l'assainissement des eaux et des sols contaminés par rapport aux processus physico-chimiques (Lovley, 1995). Les processus biologiques se produisent dans les métabolismes cellulaires naturels des espèces biologiques. Ces traitements impliquent divers organismes et microorganismes ayant la capacité d'éliminer la contamination du Cr(VI). Les microbes qui conservent ces propriétés ont été isolés d'un large éventail d'environnements, à la fois ceux contaminés et non contaminés par le Cr(VI).

1. Par les plantes

Les plantes accumulent généralement du chrome dans leurs tissus racinaires et très rarement, il est transféré jusqu'aux pousses (Lotfy and Mostafa, 2014). Ces plantes dotées d'une extraordinaire capacité d'accumulation de métaux sont des hyperaccumulatrices (Cho-Ruk et al., 2006 ; Jobby et al., 2018). Plusieurs plantes ont été étudiées pour leur capacité de bioaccumulation de Cr, notamment *Pterocarpus indicus*, *Jatropha curcas* (Mangkoedihardjo et al., 2008), *Callitriche cophocarpa* (Augustynowicz et al., 2010), *Jasminum sambac*, *Jasminum grandiflorum*, *Polyanthus tuberosa*, *Nerium oleander* et *Helianthus* sp. (Santiago and Santhamani, 2010), *Barringtonia acutangula* (Kumar et al., 2014).

De plus, *Callitriche cophocarpa* s'est avéré être un excellent accumulateur de chrome car une concentration du chrome 27 fois plus élevée a été trouvée dans les pousses fraîches par rapport à celle du milieu. Parmi les plantes à fleurs qui ont été examinées, *J. sambac* et *J. grandiflorum* ont égalemnt montré une tolérance maximale à une concentration plus élevée de chrome dans le sol. Le Cr(VI) est absorbé par les cellules végétales *via* des transporteurs de sulfate, suivi de sa réduction en Cr(III) (Cervantes et al., 2001), ces plantes sont capables de produire des enzymes spécifiques qui sont similaires à la chromate réductase bactérienne et assurent la conversion du Cr(VI) en Cr(III) (Lytle et al., 1998).

2. Par les algues

La réduction photochimique du Cr(VI) est une pratique courante pour l'élimination des composants toxiques du chrome dans l'environnement. La biomasse de *Chlorella vulgaris* a montré une efficacité dans la réduction du Cr(VI). Cela a encouragé l'intérêt à utiliser la communauté algale pour réduire le Cr(VI) de l'eau et du sol contaminés. Plusieurs efforts ont été faits pour réduire le Cr(VI) en Cr(III) par les algues car il est disponible de manière pratique et moins coûteuse.

Une microalgue de laboratoire tolérante au sel *C. vulgaris* cultivée dans un milieu de culture d'algues a été utilisée pour éliminer différents polluants dans les eaux usées de la tannerie avec une dilution de 1:1 avec de l'eau du robinet. Ces eaux usées de la tannerie contenaient 3,22 mg/L de Cr(VI) ainsi que d'autres polluants. À 28°C, les microalgues ont complètement éliminé le Cr(VI) de l'échantillon d'eau diluée en 12 jours (Deng et al., 2006 ; Gupta et al., 2009). Chen et al. (2016) ont extrait les organites des algues vertes *C. vulgaris* et les ont ensuite traitées pour les tests de réduction du Cr(VI). Ils ont observé que les chloroplastes adsorbaient non seulement 21 % du chrome total, mais réduisaient également 70 % du Cr(VI) par rapport à l'essai témoin abiotique. Ainsi, les organites de *C. vulgaris* offraient non seulement une base au mécanisme de réduction du Cr(VI), mais offraient également une nouvelle vue pour l'élimination des métaux lourds de l'eau contaminée. En plus de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella miniata* (Han et al., 2007) et l'algue verte *Cladophora albida* (Deng et al., 2009) ont également prouvé leur capacité épuratrice, où l'élimination du Cr(VI) s'est d'abord produite par sa biosorption, suivie de sa bioréduction en Cr(III) et de la biosorption du Cr(III) sur la biomasse algale.

3. Par les champignons

Les champignons ont des propriétés uniques qui les maintiennent dans les sites contaminés par des métaux toxiques en raison de la présence d'un matériau de paroi cellulaire à l'intérieur qui présente d'excellentes propriétés de liaison aux métaux. L'activité enzymatique des champignons fournit suffisamment de métabolites pour traiter les eaux usées. Les enzymes sont produites au cours de toutes les phases du cycle de vie fongique contrairement aux bactéries et quelles que soient les concentrations de polluants (Ryan et al., 2005).

Les espèces de champignons sont connues pour détoxifier les métaux toxiques par plusieurs mécanismes, notamment la précipitation extra et intracellulaire, la réaction redox et l'absorption active (Cárdenas-González and Acosta-Rodríguez, 2010). Différents produits

métaboliques de champignons comme les protéines et les ligands contenant de l'azote sur la chitine et le chitosane influencent l'absorption de métaux toxiques (Bai et al., 2012 ; Chen et al., 2012a). Les champignons peuvent s'adapter et se développer sous des concentrations élevées de métaux et dans diverses conditions extrêmes de température, de disponibilité des nutriments et de pH. Une souche fongique résistante au chrome *Fusarium* sp. isolée du sol contaminé par un effluent de tannerie a été utilisée pour une étude de réduction du Cr(VI). La souche fongique isolée a réduit une concentration élevée du Cr(VI) après 72 h dans des conditions optimales de température 25°C et pH 5,0. Différentes analyses de micro-imagerie ont révélé une rugosité de surface accrue, un gonflement important et la formation de structures en forme de cage à la surface des cellules induites par le Cr(VI) (Guria et al., 2014). Dans une autre étude, cinq souches fongiques ; *Penicillium commune, Paecilomyces lilacinus, Cladosporium perangustum, Cladosporium perangustum* et *Fusarium equiseti* isolées à partir d'échantillons de sol, de boues et d'eaux usées d'une tannerie ont montré une tolérance élevée au Cr(VI) avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) supérieure à 500 mg/L (Pradhan et al., 2017). De même, diverses souches fongiques d'*Aspergillus* (*A. niger, A. flavus, A. fumigatus, A. nidulans, A. heteromorphus, A. foetidus* et *A. viridinutans)* isolées à partir de différents échantillons de sol et d'eaux usées de l'industrie de tannage ont été utilisées individuellement pour l'élimination d'une concentration initiale du Cr(VI) de 18,1 mg/L dans des conditions de pH 3,0 et une biomasse de champignons de 4 g, l'ordre d'efficacité d'élimination du Cr(VI) était le suivant : *A. niger >A. flavus >A. umigates >A. nidulans >A. hétéromorphe >A. fœtus >A. viridinutans,* où *A. niger* a montré un remarquable taux de réduction du Cr(VI), de l'ordre de 96,3 % (Sivakumar, 2016).

4. Par les levures

Les levures sont résistantes au chrome tient davantage à leur absorption d'ions qu'à la réduction biologique du Cr(VI) en Cr(III) (Raspor et al., 2000). La bioaccumulation du Cr(VI) dans les cellules de levure a été également suggérée comme une alternative potentielle de détoxification (Ksheminska et al., 2005). En effet, de nombreuses souches de levure sont connues pour biotransformer le Cr(VI) en Cr(III), les exemples incluent ; *Saccharomyces cerevisiae, Rhodotorula pilimanae, Yarrowiali polytica, Hansenula polymorpha* (Ksheminska et al., 2006), *Pichia guilliermondii* (Ksheminska et al., 2008) et *Rhodotorula mucilaginosa* (Chatterjee et al., 2012).

Bahafid et al. (2011) ont découvert que l'élimination du Cr(VI) par *Pichia anomala* implique initialement une adsorption sur des groupes fonctionnels des surfaces cellulaires (groupe carboxyle, amide I, amide II, amide III, polysaccharides et sulfonate), suivie d'une accumulation intracellulaire et réduction de Cr(VI) en Cr(III). Bahafid et al. (2013a) ont également découvert que les trois levures *Cyberlindnera fabianii, Wickerhamomyces anomalus* et *Candida tropicalis* pouvaient être utilisées pour éliminer efficacement le Cr(VI) des sites contaminés par adsorption. Martorell et al. (2012) ont étudié la capacité de la levure à réduire le Cr(VI) où ils ont isolé deux souches de levure ; *Pichia jadinii* M9 et *Pichia anomala* M10, à partir des effluents de l'industrie des textiles. Ils ont découvert que ces levures réalisent la conversion du Cr(VI) en Cr(III) par l'enzyme chromate réductase (ChR).
D'autre part, Mahmoud and Mohamed (2017) ont étudié la biosorption du Cr(VI) à partir d'une solution aqueuse ainsi que des effluents de l'industrie de tannerie en utilisant des perles à matrice de biomasse/polymère. Ces billes ont été développées en immobilisant de la levure de boulanger dans un extrait d'alginate (3 %) et une réduction de 85 % de la concentration initiale de 200 ppm du Cr(VI) a été obtenue dans des conditions optimisées. Dans les souches résistantes au chromate de *Candida maltosa*, il a été découvert que l'activité de réduction du chromate dépendante du NAD se produisait principalement dans la fraction protéique soluble alors que la fraction membranaire étant moins active (Ramirez- Ramirez et al., 2004). D'autres études ont découvert que la détoxification du Cr(VI) se produit *via* des substances réductrices extracellulaires sécrétées par les cellules de levure (Ksheminska et al., 2006) telles que le sulfate et la riboflavine (Fedorovych et al., 2009). Le **tableau 5** présente l'utilisation de certaines espèces de champignons et de levures dans la bioremédiation du Cr(VI).

Tableau 5: Bioremédiation du Cr(VI) par certaines espèces de champignons et de levures.

Souche	Mécanisme	Concentration initiale de Cr(VI)	Taux (%)	Temps	Référence
Paecilomyces lilacinus	Biotransformation, Bioaccumulation	200 mg/L	100	120 h	Sharma and Adholeya (2011)
Pichia jadinii M9	Bioreduction	1.3 mM	36,2	1 h	Martorell et al. (2012)
Pichia anomala M10	Bioreduction	1.7 mM	52,9	3 h	Martorell et al. (2012)
Pleurotus ostreatus	Biosorption	500 mg/L	80	12 h	Carol et al. (2012)
Acremonium sp.	Biosorption, Biotransformation	100 ppm	90	10 j	Herath et al. (2014)
Penicillium griseofulvum MSR1	Biosorption	67.8 mg/L	79,9	37,5 min	Samuel and Chidambar (2015)
Aspergillus niger	Biosorption	18.125 mg/L	96,3	7 j	Sivakumar (2016)
Saccharomyces cerevi	Biosorption	200 ppm	85	24 h	Mahmoud and Mohamed (2017)

5. Par les bactéries

La remédiation microbienne du Cr(VI) est un processus rapide, économique, sans produit chimique et nécessitant moins d'énergie. Les bactéries sont principalement utilisées et se sont avérées les plus puissantes pour convertir le Cr(VI) en Cr(III) (Badar et al., 2000 ; Kanmani et al., 2012). La réduction bactérienne du Cr(VI) a été signalée pour la première fois à la fin des années 1970. Romanenko and Koren'kov (1977) ont observé une capacité de réduction du Cr(VI) chez les espèces de *Pseudomonas* cultivées dans des conditions anaérobies. La souche bactérienne active, isolée des boues d'épuration, a été identifiée comme *Pseudomonas*

dechromaticans. Depuis lors, une variété de microorganismes a été identifiée et isolée à partir d'un large éventail d'environnements avec la capacité de détoxification du Cr(VI).

Plusieurs chercheurs ont isolé des bactéries qui catalysent la réduction du Cr(VI) en Cr(III) dans diverses conditions et conceptions expérimentales, notamment des modifications du pH, de la température, de la vitesse d'agitation, aérobie et anaérobie, de la concentration initiale de Cr(VI), de la supplémentation en nutriments et de l'état des cellules (libres, immobilisées, perméabilisées…). Les bactéries dotées de la capacité de réduction du Cr(VI) sont appelées Bactéries Réductrices du Chrome (Chromium Reducing Bacteria **CRB**) (Barrera-Díaz et al., 2012 ; Dhal et al., 2013). Les CRB sont généralement isolées des effluents industriels (Somasundaram et al., 2009), en particulier ceux des industries textiles (Cetin et al., 2008), de la fabrication de galvanoplastie (Seemma et al., 2012), des mines (Dey et al., 2012) et des tanneries (Guria et al., 2014).

Les bactéries Gram positifs et négatifs ont démontré la capacité d'élimination du Cr(VI) par différents mécanismes à savoir la biosorption, bioaccumulation et/ ou bioréduction, mais il a été noté que la résistante des bactéries Gram positifs est beaucoup plus importante. Parmi les bactéries Gram positifs on cite ; *Microbacterium liquefaciens* MP30 (Pattanapipitpaisal et al., 2001), *Exiguobacterium* sp. (Alam et al., 2008), *Bacillus anthracis* (Xu et al., 2015), *Leucobacter chromiireducens* (Joutey et al., 2016), *Staphylococcus haemolyticus* (Arshad et al., 2019) ; *Bacillus* sp. CRB-1 (Zhu et al., 2019), *Oceanobacillus oncorhynchi* (Zeng et al., 2019), *Sporosarcina saromensis* W5 (Huang et al., 2021a) et *Staphylococcus gallinarum* (Harboul et al., 2022). Pour les Gram négatifs on distingue ; *Serratia marcescens* (Campos et al., 2005), *Cellulomonas* spp. (Viamajala et al., 2007), *Pseudomonas* sp. (Desai et al., 2008a), *Acinetobacter* sp. (Jin et al., 2017), *Pannonibacter phragmitetus* BB (Chai et al., 2018), *Rhodobacter sphaeroides* (Su et al., 2021).

Une liste des bactéries réductrices du Cr(VI) est présentée dans le **tableau 6**. Cependant, la bioréduction du Cr(VI) par ces bactéries est limitée par leur survie en raison de la forte toxicité du Cr(VI) à haute concentration. De plus, à des fins industrielles, l'utilisation de cellules bactériennes libres est désavantageuse pour la séparation de la biomasse-liquide et la toxicité du Cr(VI) peut entraîner des dommages aux cellules et une perte d'activité. En revanche, la technique d'immobilisation est une solution splendide à ces problèmes en raison des avantages de la stabilité, de la séparation solide-liquide et du potentiel de réutilisation (Saravanan et al., 2017).

Tableau 6 : Exemples de bactéries réductrices du Cr(VI).

Souche	Concentration initiale du Cr(VI) (mg/L)	Taux de réduction (%)	Temps (h)	Référence
Bacillus amyloliquefaciens	100	100	144	Das et al. (2014)
Bacillus pumilus CrK08	200	84	24	Rehman et al. (2015)
Stenotrophomonas maltophilia	100	98	120	Baldiris et al. (2018)
Sporosarcina saromensis W5	200	74,2	72	Zeng et al. (2019)
Bacillus sp. CRB-1	50	100	24	Zhu et al. (2019)
Bacillus sp. CRB-7	100	100	48	Wu et al. (2019)
Sporosarcina saromensis W5	200	63,25	36	Huang et al. (2021a)

Des monocultures de différentes souches bactériennes ont été utilisées dans la plupart des études de biorestauration du Cr(VI) (Zahoor and Rehman, 2009 ; Farag and Zaki, 2010 ; He et al., 2011). Cependant, dans la nature, les espèces uniques survivent rarement dans un environnement complexe. Par conséquent, l'utilisation de cultures pures dans des conditions de laboratoire contrôlées peut ne pas imiter les conditions environnementales réelles, en particulier dans les zones hautement contaminées qui ont plus d'un seul métal présent. Selon Sannasi et al. (2006), les bactéries sont plus stables et survivent mieux lorsqu'elles existent en culture mixte. De plus, les consortiums de cultures sont métaboliquement supérieurs pour éliminer les métaux et conviennent mieux à une application sur le terrain, car les organismes sont plus compétitifs et ont plus de chances de survivre (Kader et al., 2007). Compte tenu de ces avantages, d'autres chercheurs ont confirmé que les cultures de consortiums offraient une réduction plus efficace et plus courte du Cr(VI) (Joutey et al., 2011 ; El Karkouri et al., 2019).

V. Mécanismes de résistance et de réduction du Cr(VI) chez les microorganismes

Les mécanismes d'interaction entre les microorganismes, en particulier les bactéries, et les métaux lourds sont variés (Ledin, 2000). Les microorganismes sont capables de produire des substances telles que des composés organiques ou des sulfures, qui modifient la solubilité et donc la mobilité des métaux. De plus, les bactéries peuvent influencer indirectement la mobilité des métaux par des changements de l'environnement, par exemple par acidification. Ils peuvent également modifier les caractéristiques de la matière organique, ce qui modifie le comportement des métaux par des mécanismes de complexation ou de chélation. On note également la transformation des métaux par des procédés d'oxydo-réduction ou d'alkylation. Les métaux peuvent s'accumuler à l'intérieur des cellules par des phénomènes d'adsorption passive (indépendants du métabolisme) ou par transport actif à l'intérieur de la cellule (dépendant du métabolisme). Tous ces changements modifient généralement la mobilité et la toxicité du métal et ces différents mécanismes sont résumés dans la **figure 6**.

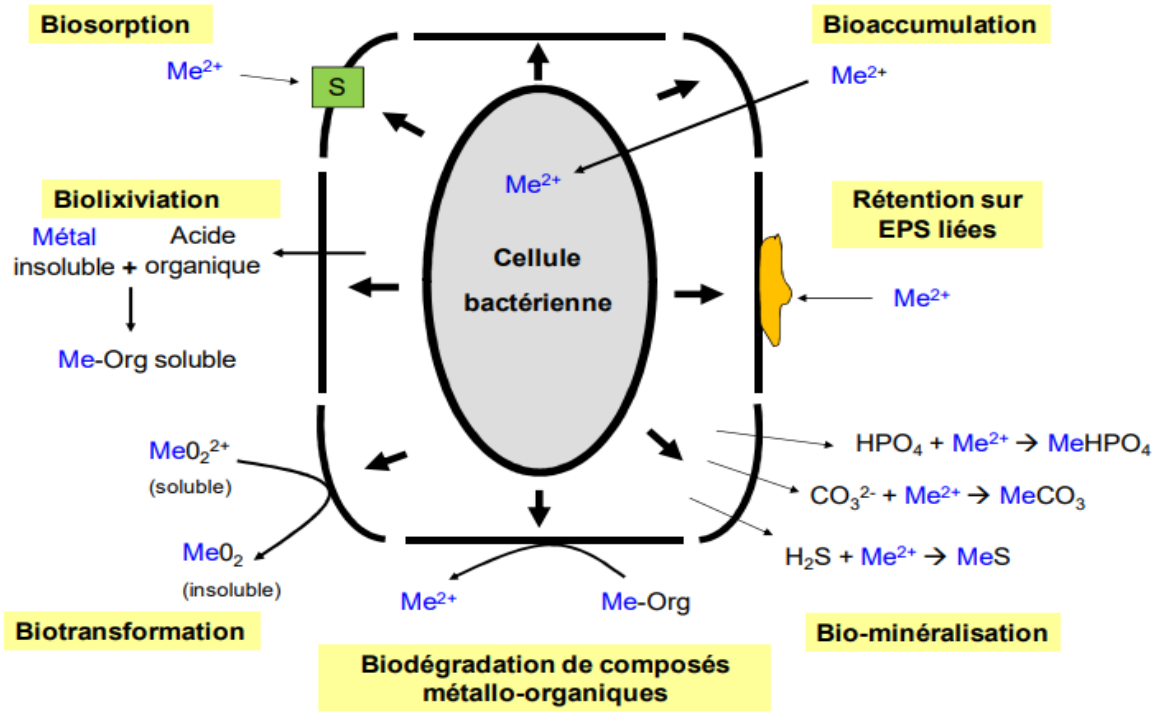


Figure 6 : Réactivité des bactéries *vis-à-vis* des métaux.

- **S** correspond aux groupements réactifs présents sur la paroi bactérienne,
- **Org** correspond à un composé organique,
- **Me^{2+}** correspond à un cation métallique (Ledin, 2000).

Chez les bactéries, les mécanismes de résistance au Cr(VI) sont principalement d'origine plasmidique, tandis que les gènes de la chromate réductase se trouvent à la fois sur les plasmides et sur le chromosome (Joutey et al., 2015).

1. Système d'efflux

En tant qu'analogue structurel du sulfate (SO_4^{2-}), le Cr(VI) pénètre dans les cellules par le biais de systèmes d'absorption de sulfate. Si les bactéries possèdent des chromates réductases intracellulaires, le Cr(VI) sera réduit en Cr(III). Sinon, le Cr(VI) accumulé à l'intérieur de la cellule induit l'opéron chr et active la pompe à efflux de chromate qui est codée par le gène chrA. Par conséquent, la cellule bactérienne est protégée de la toxicité du Cr(VI) en étant repoussée à l'extérieur de la cellule comme exprimé dans la **figure 7**.

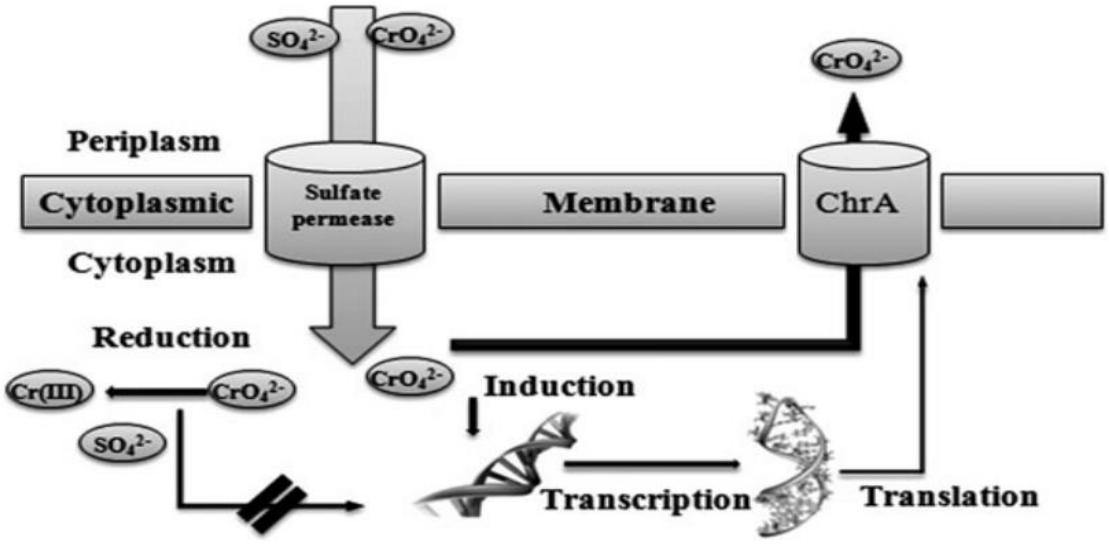


Figure 7 : Mécanismes de résistance des microorganismes *via* la réduction intracellulaire du Cr(VI) en Cr(III) et son éjection par le système d'efflux (Desjardin, 2002).

Le mécanisme d'efflux pour les bactéries résistantes au chrome est décrit par la formation de la protéine hydrophobe ChrA, un produit du gène chrA. La tolérance au chromate conférée par la protéine ChrA était associée à une accumulation réduite de CrO_4^{2-} chez plusieurs bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Alcaligenes eutrophus* et c'était l'hypothèse émise par Alvarez et al. (1999) que ChrA était impliqué dans l'extrusion des ions chromate. Branco et al. (2008) ont rapporté que la souche hautement tolérante *Ochrobactrum tritici* survivait à des concentrations de chromate supérieures à 50 mM et possédait le transposon TnOtChr, qui contient un groupe de gènes chrB, chrA, chrC et chrF. Les protéines ChrB et ChrA étaient essentiels pour établir une résistance élevée chez *O. tritici*. Ils ont également

signalé que le promoteur chr était fortement induit par le chromate ou le dichromate mais ne répondait absolument pas au Cr(III), aux oxydants, au sulfate ou à d'autres oxyanions. L'induction de l'opéron chr a supprimé l'accumulation de chrome cellulaire grâce à l'activité d'une pompe à efflux de chromate codée par ChrA (Branco et al., 2008).

Juhnke et al. (2002) ont rapporté que *Cupravidus metallidurans* et *Pseudomonas aeruginosa* servaient d'organismes modèles pour l'efflux de chromate qui se produisant *via* la protéine ChrA et présentent des niveaux de résistance de 4 et 0,3 mM, respectivement. Cependant, l'efflux de chromate n'a été identifié biochimiquement que comme un mécanisme de résistance chez *Proteobacteria* (Branco et al., 2008). La souche *Lysinibacillus fusiformis* ZC1 s'est avérée contenir un grand nombre de gènes de résistance aux métaux, tels que le gène chrA, qui code pour un transporteur de chromate putatif qui confère une résistance au chromate. Un gène yieF et plusieurs gènes codant pour des réductases éventuellement impliquées dans la réduction du chromate ont également été trouvés ; de plus, l'expression de deux gènes putatifs adjacents liés à la réduction du chromate, nitR et yieF, a été considérée comme constitutive (He et al., 2011).

2. Biosorption et Bioaccumulation

La biosorption microbienne des métaux lourds comprend deux phases : une phase initiale rapide impliquant une adsorption physique ou un échange d'ions à la surface cellulaire et une phase ultérieure plus lente impliquant un transport actif des métaux lourds dépendant du métabolisme des cellules bactériennes (Gupta et al., 2019). Saha and Orvig (2010) ont proposé quatre mécanismes de biosorption du chrome :

(i) <u>Adsorption anionique</u> : dans ce cas, les espèces de chrome chargées négativement se lient aux groupements fonctionnels chargés positivement présents à la surface du biosorbant. Cette méthode de biosorption dépend du pH. A faible pH, l'adsorption de chrome augmente tandis qu'elle diminue avec la réduction du pH du milieu.

(ii) <u>Réduction couplée à l'adsorption</u> : Dans ce mécanisme, la biomasse réduit complètement le Cr(VI) en Cr(III) en présence d'un acide. Ensuite, le Cr(III) est adsorbé par la biomasse.

(iii) <u>Adsorption anionique et cationique</u> : Dans ce mécanisme, une partie du Cr(VI) est réduite en Cr(III). Une partie du Cr(VI) sous forme d'anion et du Cr(III) sous forme de cation est adsorbée par la biomasse.

(iv) <u>Mécanisme de réduction et d'adsorption anionique</u> : Dans ce mécanisme, une partie du Cr(VI) est réduite en Cr(III) et généralement le Cr(VI) est adsorbé par le biosorbant tandis que le Cr(III) reste dans la solution (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Biosorption du chrome des effluents de tanneries par des souches bactériennes.

Souche	Taux d'élimination du Cr(VI)	Référence
Bacillus sp. QC1-2	99 %	Campos et al. (1995)
Bacillus megaterium	32,0 mg Cr/g poids sec	Srinath et al. (2002)
Bacillus circulans	34,5 mg Cr/g poids sec	Srinath et al. (2002)
Bacillus circulans	48 %	Khanafari et al. (2008)
Bacillus sp.	97-98 %	Varadhan and Mohan (2017)
Staphylococcus sp.	92-93 %	Varadhan and Mohan (2017)

La forme trivalente du chrome est pratiquement imperméable aux membranes biologiques. Cependant, dans les solutions aqueuses, le Cr(III) forme facilement un complexe avec des molécules de ligand biologiquement pertinentes, ces complexes sont captés par les cellules (Ksheminska et al., 2005). Le Cr(VI) existe sous forme de CrO_4^{2-} dans des solutions aqueuses, cette forme est structurellement similaire à d'autres anions tels que SO_4^{2-} et PO_4^{2-}. Le Cr(VI) pénètre dans les cellules par deux mécanismes principaux : un transport facilité par un canal anionique non sélectif et des transporteurs de sulfate.

Long et al. (2013a) ont isolé *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* LY6, une espèce qui n'avait pas été signalée auparavant dans l'élimination du Cr(VI). L'analyse par microscopie électronique à transmission et spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (MET-EDX) a confirmé que la souche LY6 pouvait accumuler du chrome dans la cellule tout en éliminant le Cr(VI). A l'intérieur des cellules, le Cr(VI) est rapidement réduit en Cr(III) et donc la concentration de Cr(VI) ne sera jamais égale des deux côtés de la membrane plasmique. En effet, la capacité de réduction des cellules est la principale puissance par laquelle le Cr(VI) est bioaccumulé (Joutey et al., 2015).

3. Réduction du Cr(VI)

La réduction du chromate (CrO_4^{2-}) n'est généralement pas considérée comme un mécanisme de résistance (Cervantes and Silver, 1992), par conséquent, la réduction du chromate et la

résistance sont des processus indépendants (Verma et al., 2009). Les bactéries réduisent le Cr(VI) par des moyens chimiques (indirects) ou enzymatiques (directs). La réduction chimique du Cr(VI) implique des composés comme la cystéine, le glutathion, le sulfite et les thiosulfates (Donati et al., 2003). La réduction enzymatique du Cr(VI) est réalisée par des réductases solubles et/ ou liées à la membrane qui existent dans une gamme variée de bactéries aérobies, facultatives et anaérobies (Ramirez-Diaz et al., 2008).

3.1. Réduction aérobie

En présence d'oxygène, la réduction bactérienne du Cr(VI) se produit généralement sous la forme d'un processus en deux ou trois étapes, le Cr(VI) étant initialement réduit en intermédiaires à courte durée de vie Cr(V) et/ou Cr(IV) avant une nouvelle réduction en le produit final thermodynamiquement stable, Cr(III). Néanmoins, on ignore actuellement si la réduction du Cr(V) en Cr(IV) et du Cr(IV) en Cr(III) était spontanée ou à médiation enzymatique. Le NADH, le NADPH et l'électron de la réserve endogène sont impliqués comme donneurs d'électrons dans le processus de réduction du Cr(VI) (Appenroth et al., 2000). La réductase ChrR réduit transitoirement le Cr(VI) avec une navette à un électron pour former le Cr(V), suivie d'un transfert à deux électrons pour générer le Cr(III). Bien qu'une proportion de l'intermédiaire Cr(V) soit spontanément réoxydée pour générer des ERO, sa réduction par transfert de deux électrons catalysé par ChrR réduit la possibilité de produire des radicaux nocifs (Ackerley et al., 2004).

L'enzyme YieF est unique en ce qu'elle catalyse la réduction directe de Cr(VI) en Cr(III) par un transfert à quatre électrons, dans lequel trois électrons sont consommés dans la réduction de Cr(VI) et l'autre est transféré à l'oxygène. Étant donné que la quantité des ROS générés par YieF dans la réduction de Cr(VI) est minime, elle est considérée comme une réductase plus efficace que ChrR pour ce processus (Park et al., 2002). La chromate réductase associée à la membrane isolée de *B. megaterium* TKW3 a utilisé le NADH comme donneur d'électrons, mais la cinétique de réduction de Cr(VI) n’a été pas caractérisée (Cheung et al., 2006). Un schéma illustrant le mécanisme de la réduction enzymatique de Cr(VI) est présenté sur la **figure 8**.

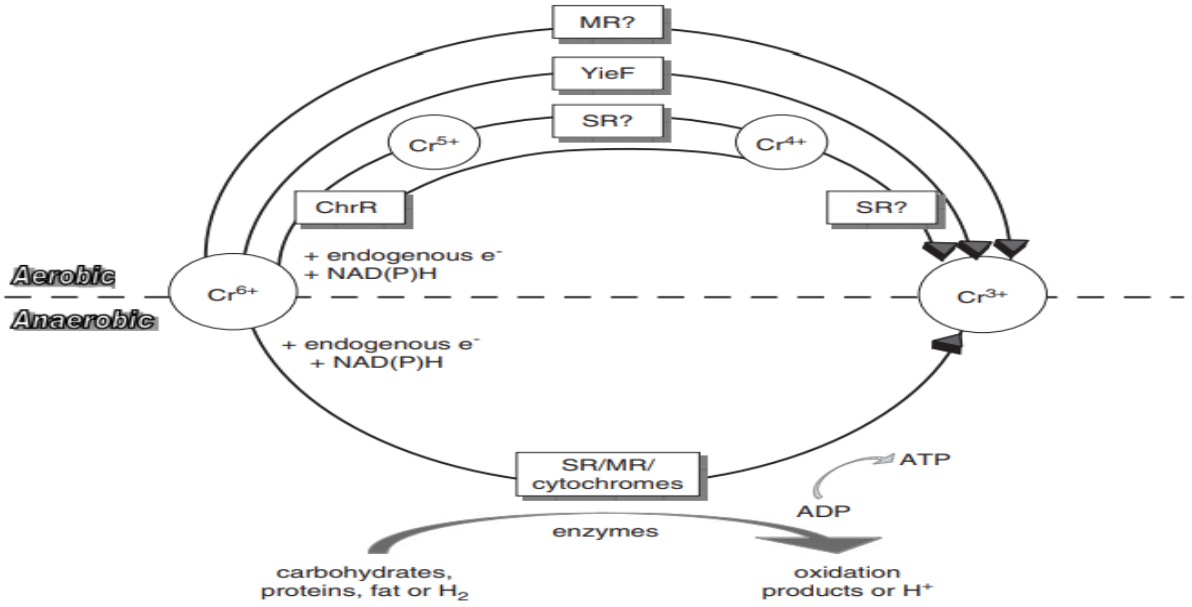


Figure 8 : Mécanismes de la réduction enzymatique de Cr(VI) dans des conditions aérobies et anaérobies (Cheung and Gu, 2007).

3.2. Réduction anaérobie

Dans des conditions anaérobies, les enzymes solubles et liées à la membrane catalysent le processus de réduction du Cr(VI) (Cheung and Gu, 2006). Dans cette réaction, le Cr(VI) sert d'accepteur d'électrons terminal dans la chaîne respiratoire, tandis que les glucides, les protéines, les graisses, l'hydrogène et le NAD(P)H servent de donneur d'électrons. Le potentiel de réduction du Cr(VI) des anaérobies est associé à leur système de transfert d'électrons catalysant la navette électronique avec la chaîne respiratoire (Wang, 2000). Les métabolites naturels des anaérobies tels que le H_2S produit par les Bactéries Sulfato-Réductrices (BSR) sont des réducteurs chimiques efficaces du Cr(VI) dans un environnement anoxique (Fude et al., 1994 ; Wielinga et al., 2001).

Dans le passé, la réduction anaérobie du Cr(VI) était considérée comme un processus fortuit qui ne fournit aucune énergie pour la croissance microbienne (Wang and Shen, 1995). Cependant, il a été découvert qu'un isolat de BSR utilisait pour sa croissance l'énergie générée lors de la réduction anaérobie du Cr(VI) (Tebo and Obraztsova, 1998). La réduction du Cr(VI) chez *Desulfovibrio vulgaris* s'est avérée impliquer un cytochrome c3 soluble (Lovley, 1995). De même, chez *Desulfomicrobium norvegicum*, une hydrogénase et un cytochrome de type c ont catalysé la réduction du Cr(VI) (Chardin et al., 2002 ; Michel et al., 2001). La réduction anaérobie typique du Cr(VI) est illustrée dans la **figure 8**.

3.3. Réduction extracellulaire

Les enzymes extracellulaires sont produites par les bactéries et sont exportées dans le milieu pour réduire le Cr(VI). Plusieurs études ont rapporté le rôle de la chromate réductase extracellulaire produite par les bactéries dans la remédiation du Cr(VI). La chromate réductase extracellulaire produite par *Pseudomonas putida* dans la réduction du Cr(VI) est rapportée par Priester et al. (2006). Rath et al. (2014) ont également signalé la production de la chromate réductase par *Bacillus amyloliquefaciens* isolée de l'environnement d'une mine de chromite. *Bacillus methylotrophicus* isolée par Mala et al. (2015) a aussi montré une activité extracellulaire pour la réduction du Cr(VI). Wang et al. (1991) ont rapporté que les bactéries avec des réductases liées à la membrane peuvent également réduire le Cr(VI) par des processus extracellulaires.

3.4. Réduction liée à la membrane

Le Cr(VI) agit comme un accepteur d'électrons dans un processus médié par une chromate réductase liée à la membrane, qui est active dans les chaînes respiratoires impliquant des cytochromes (Wang et al., 1991). Une chromate réductase associée à la membrane de *Thermus scotoductus* SA-01 a été purifiée jusqu'à homogénéité apparente et il a été démontré qu'elle couple la réduction du Cr(VI) à l'oxydation du NAD(P)H, avec une préférence pour le NADH. L'homologie de séquence a identifié la protéine comme une dihydrolipoamide déshydrogénase (Opperman and van Heerden, 2008a). Un dosage de la chromate réductase du *Bacillus subtilis* alcaliphile a indiqué que la réduction du Cr(VI) était médiée par des enzymes constitutives liées à la membrane et une diminution du pH avec la croissance de la bactérie signifiait le rôle joué par les métabolites (acides organiques) dans les mécanismes de résistance et de réduction du chrome (Mangaiyarkarasi et al., 2011). Chez *Oceanobacillus oncorhynchi* W4, il s'agit de la fraction membranaire (Zeng et al., 2019), tandis que *Bacillus* sp. M6 implique à la fois la fraction membranaire et cytosolique dans la réduction du Cr(VI) (Li et al., 2019).

3.5. Réduction intracellulaire

La réduction intracellulaire du Cr(VI) est médiée par les enzymes chromates solubles dans le cytoplasme. Le processus intracellulaire implique l'utilisation de donneurs d'électrons. Bien qu'il ait été démontré que des enzymes spécialisées réduisant le Cr(VI) (réductases) existent à l'intérieur des cellules bactériennes, plusieurs composants du protoplasme de la cellule

réduisent également le Cr(VI). Des composants tels que le NADH (NADPH chez certaines espèces), les flavoprotéines et d'autres hémoprotéines réduisent facilement le Cr(VI) en Cr(III) (Ackerley et al., 2004). On s'attend donc à ce que la fraction cytoplasmique des cellules rompues de la plupart des organismes réduise le Cr(VI). Un tel processus de réduction ne consomme pas d'énergie mais affectera directement la cellule, puisque la plupart des protéines intracellulaires catalysent une réduction à un électron de Cr(VI) en Cr(V). Lorsque cela se produit, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) nocives sont générées et endommagent l'ADN (Joutey et al., 2015).

La réduction intracellulaire du Cr(VI) a été détectée pour plusieurs bactéries, par exemple, *Streptomyces* sp. MC1 (Polti et al., 2011), *Bacillus* sp. SUCR44, *Bacillus thuringiensis* SUCR186, *Bacillus subtilis* SUCR188 (Soni et al., 2013), *Bacillus amyloliquefaciens* (Das et al., 2014), *Stenotrophomonas maltophilia* (Baldiris et al., 2018) et *Sporosarcina saromensis* W5 (Huang et al., 2021a). La **figure 9** résume l'ensemble des mécanismes de résistance et de réduction du Cr(VI) par les microorganismes (Jobby et al., 2018).

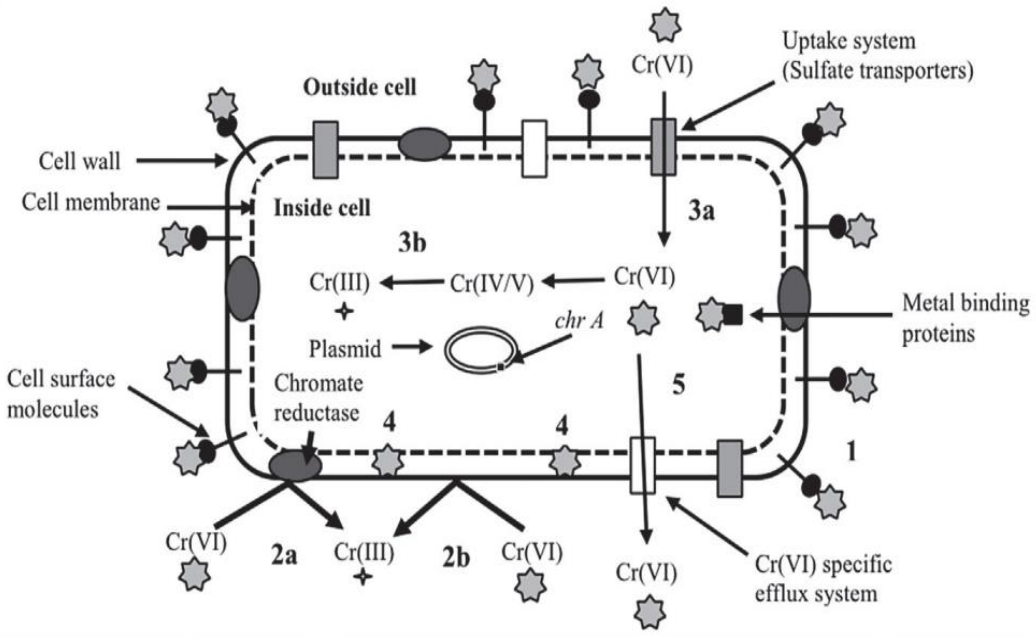


Figure 9 : Les mécanismes de résistance et de réduction du Cr(VI) par une cellule microbienne.

1 : Adsorption du Cr(VI) sur la cellule ; **2a** : Réduction du Cr(VI) en Cr(III) *via* l'enzyme chromate réductase ; **2b** : Conversion spontanée ; **3a** : Absorption du Cr(VI) par les transporteurs de sulfate ; **3b** : À l'intérieur de la cellule, réduction du Cr(VI) en Cr(III) *via* des intermédiaires hautement instables Cr(V/IV). Translocation intracellulaire du Cr(VI) à l'aide de protéines de liaison aux métaux ; **4** : Accumulation de Cr(VI) dans la paroi cellulaire ; **5** : Elimination de l'excès de Cr(VI) par un système d'efflux spécifique au chrome.

VI. Valorisation des effluents de tanneries traités par irrigation

1. Effluents de l'industrie du tannage

Ces dernières années, l'eau, cette ressource indispensable et irremplaçable, a été particulièrement mal répartie et par conséquent devient une préoccupation mondiale. En effet, 4,3 % de la population mondiale ne dispose que de 0,67 % de ressources renouvelables en eau douce (Mutin, 2007). De plus, le besoin en ressources en eau augmente fortement. Ceci est principalement dû aux activités humaines et à l'industrialisation en particulier. Les effluents industriels et domestiques ont été reconnus comme les principales sources de pollution des eaux par les produits chimiques toxiques. Dans le monde, les industries de tanneries sont connues comme une source majeure de pollution par les métaux lourds (Mannucci et al., 2010).

Au Maroc, la ville de Fès est considérée comme la ville de l'artisanat, qui comprend plusieurs et diverses unités artisanales traditionnelles et modernes, à savoir les tanneries. Avec la croissance des populations, l'augmentation de la demande de cuir et de ses produits a conduit à l'implantation de grandes unités de tannerie moderne. Le processus de tannage implique la transformation de la peau animale en cuir. Actuellement, dans le monde, entre 70 et 80 % du cuir est produit par le procédé de tannage au chrome et le reste par le tannage végétal (Bajza et al., 2004). D'énormes volumes d'eau sont consommés, environ 35 à 40 litres d'eau sont utilisés par kilogramme de peau traitée. Avec une capacité annuelle globale de 9×10^6 tonnes de peaux traitées, on estime que 30 à 40×10^7 m^3 des eaux usées sont générés (Ramasami and Prasad, 1991 ; Neto et al., 2004). De plus, la peau est traitée avec plusieurs produits chimiques ; des sels minéraux, des colorants et du Cr^{3+}, qui s'oxyde avec le temps dans les conditions environnementales, pour obtenir du cuir. Les produits chimiques toxiques utilisés finissent ainsi dans les eaux usées avec une contribution nette de charge polluante (Suthantharajan et al., 2004).

La **figure 10** illustre les différentes opérations de fabrication du cuir. Les effluents générés par ces tanneries sont très toxiques et ils ont des impacts néfastes sur la santé humaine et l'environnement, notamment l'eau (Sarker et al., 2013). De ce fait, le rejet aveugle d'effluents et de boues de tanneries riches en métaux toxiques constitue une grave menace pour l'environnement. Ainsi, le traitement de ces effluents avant leur rejet dans le milieu naturel est absolument indispensable (Singh and Sinha, 2005).

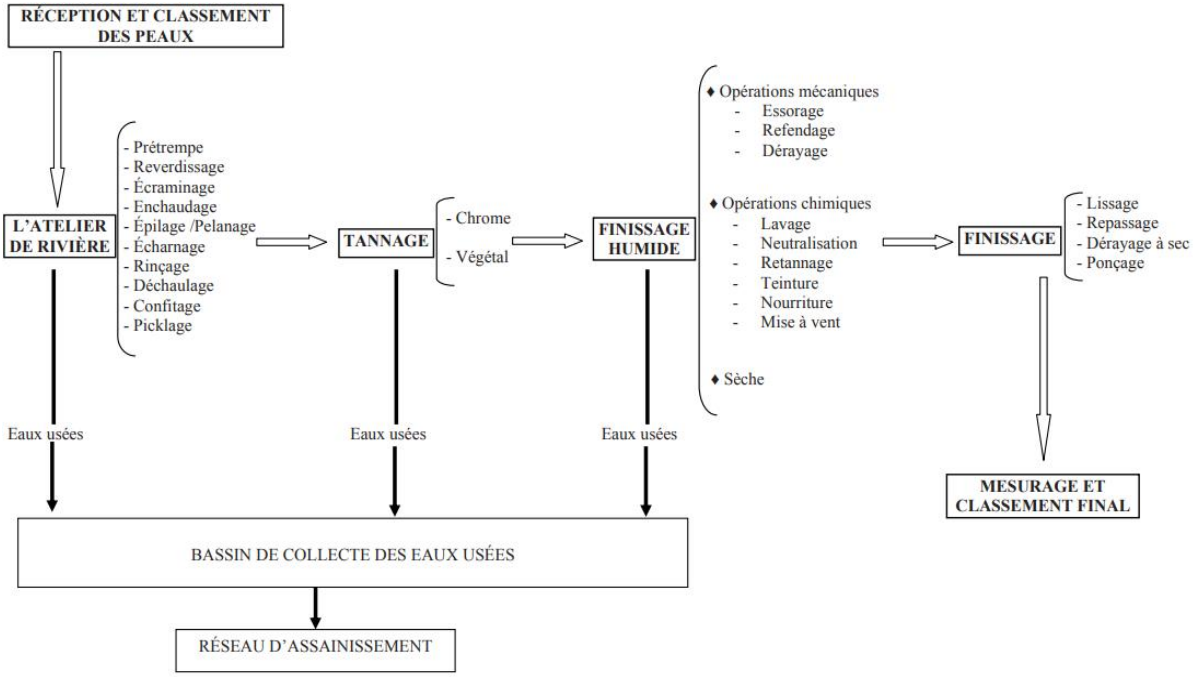


Figure 10 : Schéma des opérations du processus de fabrication du cuir et du flux des eaux usées (Aboulhassan et al., 2008).

2. Valorisation des effluents de tanneries

Les recherches actuelles s'intensifient dans le but de traiter les effluents pollués par les métaux lourds, d'une part pour lutter contre la pollution, d'autre part pour l'utilisation d'eaux usées traitées en irrigation, le temps où les ressources en eau dans le monde, en particulier dans le Maroc, ne cessent de diminuer. Le stress hydrique est en effet une préoccupation majeure dans la région méditerranéenne. Sachant qu'une grande partie de la population mondiale « pauvre en eau » vit dans le bassin méditerranéen, dont les ressources hydriques sont inégalement réparties. Et où le manque d'eau existe essentiellement dans les pays du Sud et de l'Est de la Méditerranée. Le manque d'eau dont souffre le Maroc est aujourd'hui un problème urgent susceptible d'imposer à ce pays, pour les décennies à venir, des contraintes importantes pour son développement économique et sa sécurité alimentaire. Le secteur agricole sera la première victime du manque d'eau. Cette situation s'aggrave quand on sait que l'agriculture embauche environ 40 % des actifs du pays et que le secteur agricole est le premier consommateur d'eau au Maroc (plus de 85 % d'eau disponible) (Bennouna, 2020). Le **tableau 8** montre les différences qui existent en termes de consommation d'eau par les pays méditerranéens dans le secteur agricole. On voit ainsi la part du lion de l'agriculture dans la consommation d'eau dans un grand nombre de pays, notamment le Maroc.

Tableau 8 : Consommation d'eau par certains pays méditerranéens dans le secteur agricole durant la période 2000-2011 (Secat and Gallego, 2013).

Pays	% de consommation
Grèce	89
Syrie	88
Maroc	87
Egypte	86
Lybie	83
Tunisie	76
Turquie	74
Espagne	61
Algérie	61
Liban	60

Dans de nombreux pays en développement, comme l'Inde par exemple et en raison de la non-disponibilité de sources alternatives d'eau d'irrigation, les agriculteurs irriguent leurs cultures avec des effluents industriels ayant un niveau élevé de plusieurs métaux toxiques (Cu, Cd, Cr, Zn, Fe, Ni, Mn et Pb) (Kumar and Chandra, 2004). Il est important pour les agriculteurs de diluer et de traiter ces effluents avant de les utiliser dans les pratiques agricoles et une évaluation des risques pour les métaux toxiques présents dans les parties comestibles des cultures irriguées avec des effluents est nécessaire. Plusieurs auteurs ont rapporté que les effluents/boues industriels dilués ou traités ont pour effet d'améliorer la croissance des plantes et la productivité des cultures (Abbas et al, 2008 ; Bose et al, 2008 ; Chandra et al, 2008).

Le schéma d'élimination du chrome hexavalent à partir des eaux usées et leurs utilisations en irrigation est illustré à la **figure 11**. Le développement d'une méthode in situ pour l'élimination efficace du Cr(VI) nécessite une évaluation initiale du site suivie de la sélection de la souche bactérienne en fonction de l'étendue de la contamination. Cependant, il convient de noter que la technologie adaptée pour l'élimination du Cr(VI) doit respecter les normes et les exigences réglementaires (Narayani and Shetty, 2013).

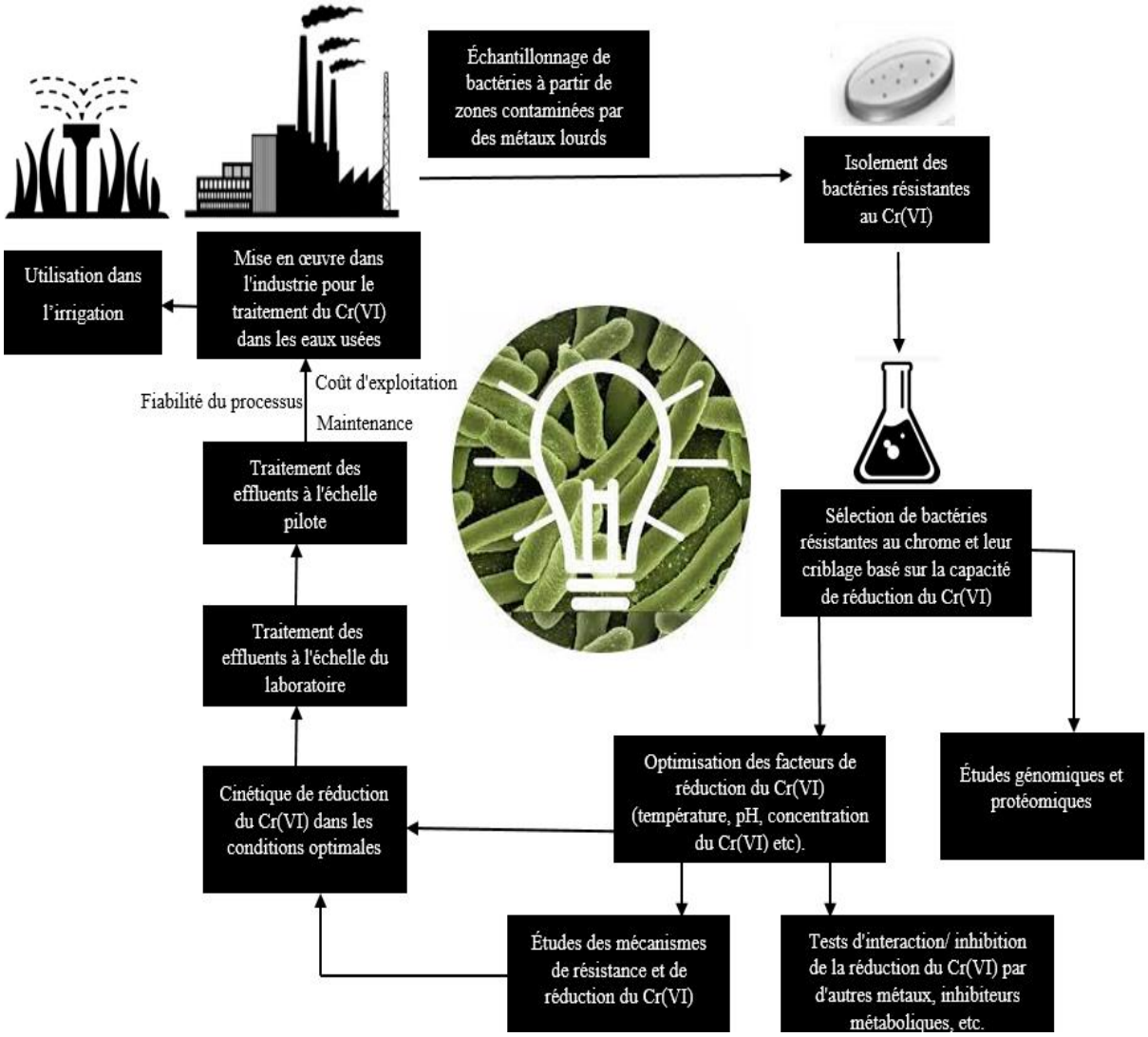


Figure 11 : Démarche de traitement et d'utilisation des effluents pollués au Cr(VI) par des bactéries réductrices du Cr(VI).

Matériel et méthodes

I. Présentation et caractérisation des sites d'échantillonnage

1. Présentation des sites d'échantillonnage

Les sites d'échantillonnage sont des mines abandonnées situées dans la région de Taza, au Nord-Est du Maroc. Cette zone est entourée par les reliefs du rif et moyen atlas et caractérisée par des anciens sites d'exploitation de minerais de fer, de cuivre et de plomb. A partir de cette région nous avons sélectionné trois sites pour prélever des échantillons du sol. La **figure 12** présente la localisation géographique de ces trois sites :

- **Site P1** : Mine de fer abandonnée (34°05'55.6"N 4°01'52.1"W).
- **Site P2** : Mine de fer abandonnée (34°04'56.1"N 4°06'40.2"W).
- **Site P3** : Mine de de plomb et de cuivre abandonnée (34°04'06.6"N 4°08'43.3"W).
- **Site R** : Site témoin de référence situé dans le jardin de la faculté polydisciplinaire de Taza (34°22'97.1"N 3°99'67.5"W).

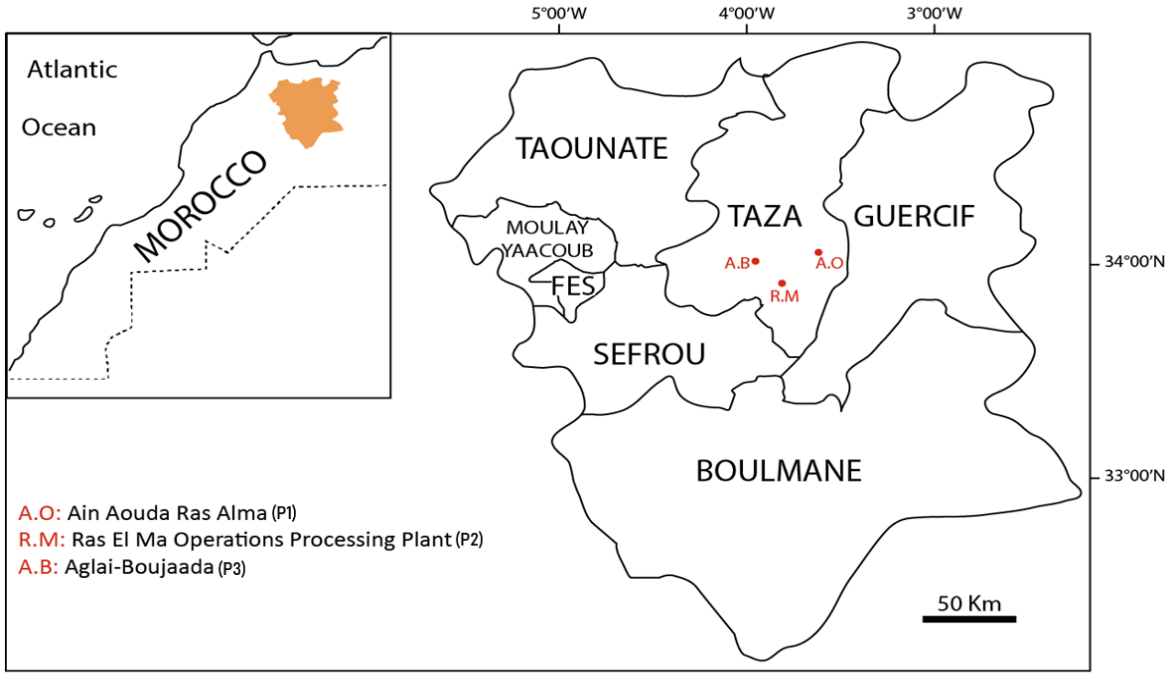


Figure 12 : Localisation géographique des différents sites d'échantillonnage.

2. Prélèvement des échantillons du sol

L'échantillonnage du sol a réalisé le 20 février 2018. Les échantillons ont été prélevés de manière aseptique, selon le protocole décrit par Vora and Modi (2013). A partir de chaque site, 5 échantillons ont été prélevés au hasard à l'aide d'une spatule stérile à partir d'une profondeur de 5 cm. Les échantillons prélevés ont été placés dans des flacons stériles

étiquetés, conservés à température ambiante et transportés au laboratoire pour analyse. Les échantillons de sol ont été homogénéisés, séchés au laboratoire à température ambiante, tamisés à l'aide d'un tamis de 2 mm de diamètre et conservés à 4°C.

3. Caractérisation physico-chimique des échantillons du sol

Les échantillons du sol ont fait l'objet de certaines analyses physico-chimiques, à savoir ; la température, le potentiel hydrogène (pH), la conductivité électrique (CE) et la concentration des métaux lourds.

3.1. Mesure de la température et du pH

La température des échantillons du sol a été mesurée manuellement dans le terrain à l'aide d'un thermomètre. Alors que le pH a été mesuré dans de l'eau déminéralisée à raison de 10 g du sol dans 50 mL de l'eau distillée. Le mélange a été agité pendant 15 min. Après une décantation de 2 h, le pH du mélange a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre (CONSORT C535, Turnhout, Belgium) (AFNOR, 1978).

3.2. Mesure de la conductivité électrique

La conductivité électrique a été mesurée dans de l'eau distillée à raison de 5 g du sol dans 25 mL de l'eau distillée, le mélange a été agité pendant 30 min, laissé décanter de 5 à 15 min, ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. La conductivité électrique a été mesurée à l'aide d'un conductimètre (CONSORT C535, Turnhout, Belgium) (AFNOR, 1977).

3.3. Dosage du chrome total et des autres métaux

Les concentrations du chrome total (Cr), plomb (Pb), cuivre (Cu), zinc (Zn), fer (Fe), calcium (Ca) et sodium (Na) ont été déterminées ; après préparation et minéralisation des échantillons du sol dans l'eau régale (Alsac, 2007) (paragraphe VII.2.1); à l'aide de la Spectroscopie à Emission Atomique avec Plasma à Couplage Inductif (ICP-AES : Inductively Coupled Plasma/ Atomic Emission Spectrometer) (HORIBA JOBIN YVON Type Activa, S/N : OVOU/1048) à la Cité de l'Innovation de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès Maroc.

II. Isolement, criblage, caractérisation et identification des bactéries résistantes au Cr(VI) et aux autres métaux lourds

Dans le but de valoriser les ressources microbiennes, en particulier bactériennes, et d'exploiter leur pouvoir réducteur du Cr(VI), nous avons réalisé cette étude axée sur l'isolement et la caractérisation de bactéries métallo-résistantes isolées à partir de biotopes extrêmes : sol des mines abandonnées dans la région de Taza-Maroc.

Le milieu de culture utilisé pour le dénombrement, l'isolement et la purification des isolats bactéries est le milieu riche Luria Bertani (LB) agar (peptone 10 g, NaCl 10 g, extrait de levure 5 g, agar 17 g). Ce milieu est largement utilisé pour l'isolement et la croissance des bactéries (Bertani, 2004). Dans chaque expérience, le pH initial du milieu a été ajusté à l'aide d'acide chlorhydrique (10%) ou l'hydroxyde de sodium (10%).

1. Dénombrement microbien du sol

Pour chaque site d'étude, le dénombrement a été effectué en mélangeant 5 g d'échantillon de sol avec 45 mL d'eau physiologique (NaCl 0.9%) stérile dans un flacon erlenmeyer. L'homogénéisation des échantillons a été effectuée par agitation pendant 30 min à 30°C, à partir de cette suspension une série de dilution de 10 fois (10^{-1} à 10^{-8}) a été réalisée dans l'eau physiologique stérile. Une aliquote de 100 µL a été étalée uniformément sur milieu LB agar. Les boîtes ont été incubées à 30°C et les colonies bactériennes ont été dénombrées après 48 h d'incubation.

Le nombre des bactéries dans les échantillons du sol a été exprimé en UFC/mL et déterminé selon la formule ci-dessous :

$$\mathbf{N\ (UFC/ml) = n/(V.d)}$$

Où : **N** (UFC/mL) : nombre d'unités formant colonies par mL ; **n** : nombre de colonie ; **V** : volume étalé (mL) ; **d** : dilution

2. Isolement et purification des isolats bactériens

L'isolement des isolats bactériens résistants au Cr(VI) est réalisé par repiquage de colonies de différents aspects morphologiques (taille, couleur, contour, élévation, … etc.) dans des boites de gélose LB contenant des concentrations croissantes de Cr(VI) (100 - 1000 mg/L) sous forme de bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) et incubé à 30°C pendant 48 h. Les isolats

bactériens ainsi purifiés ont été ensemencés sur des boîtes de gélose LB additionnée de 300 mg/L de Cr(VI).

3. Tests de résistance aux métaux

3.1. Test semi quantitatif

Les isolats bactériens tolérants 300 mg/L de Cr(VI) sur LB agar ont été soumis au test semi quantitatif de résistance au Cr(VI) et aux autres métaux lourds $Pb(NO_3)_2$, $3CdSO_4$, $HgCl_2$, $CoCl_2$, $NiSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $FeCl_3$. Les isolats bactériens ont été ensemencés sur des boites de LB agar supplémentées par les métaux testés à des concentrations croissantes de 5 à 2000 mg/L et incubées à 30°C pendant 48 h. La croissance a été évaluée jusqu'à ce que l'isolat soit incapable de produire des colonies sur le milieu et sur la base de cette évaluation la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée (Holt et al., 1994).
Les solutions mères (10 g/L) du chrome hexavalent et d'autres métaux lourds ont été préparées par filtration (0,22 µm) et ajoutées selon les concentrations souhaitées dans le milieu LB agar préalablement stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

3.2. Test quantitatif

Les isolats bactériens multi-résistantes au Cr(VI) et aux autres métaux sur LB agar ont été soumis au test quantitatif pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de différents métaux (Cr(VI), Hg, Cd, Pb, Cu, Co, Ni, Zn et Fe) dans LB liquide, en appliquant la technique de microdilution décrite par Güllüce et al. (2007), avec quelques modifications.
Les microdilutions ont été préparées par transfert de 100 µL de mélange milieu-métal contenu dans les puits de la première colonne vers les autres puits de la 2ème à la 9ème colonne. Les trois dernières colonnes de la microplaque (10, 11 et 12) qui ne contiennent pas le métal ont été considérées comme témoins de stérilité et témoins positifs pour la croissance de l'isolat. L'ensemencement a été réalisé en ajoutant 10 µL de la suspension bactérienne préparée et standardisée à 0,5 McFarland, dans tous les puits de la microplaque, sauf les puits de la 10ème colonne (témoin de stérilité). La microplaque a été scellée et incubée à 30°C pendant 24 h. Comme indicateur de croissance, 0,5 mg/mL de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) a été préparé dans de l'eau distillée stérile et 25 µL ont été ajoutés dans tous les puits. Les microplaques ont été incubées à 30°C pendant 30 min et la concentration minimale de métal qui inhibait la croissance a été prise comme CMI.

4. Caractérisation morphologique, biochimique et métabolique des isolats bactériens

Sur la base des résultats de la CMI du Cr(VI) et d'autres métaux lourds sur LB agar et liquide, six isolats bactériens ; de haute performance ; capables de résister à des concentrations élevées du Cr(VI) et d'autres métaux lourds ont été sélectionnés pour les travaux ultérieurs de cette étude. Trois isolats bactériens ont été isolés du 1er site, un isolat du 2ème et 2 isolats du 3ème site.

4.1. Caractérisation morphologique

La caractérisation morphologique des six isolats bactériens sélectionnés a été effectuée sur la base de leurs aspects macroscopiques et microscopiques.

- La caractérisation macroscopique a été basée sur un ensemble de caractères culturels des isolats bactériens sur boîte de gélose LB : la forme, la couleur, l'aspect, la taille, … etc.
- La caractérisation microscopique des isolats bactériens a été réalisée par coloration de Gram qui permet de différencier les bactéries selon leur capacité de fixer le cristal violet, autrement dit selon la structure de leur paroi (Prescott et al., 2003). La coloration consiste à étaler un frottis bactérien sur une lame contenant une goutte d'eau distillée, à sécher le frottis et à déposer quelques gouttes de cristal violet. Laisser agir 1 minute. Rincez très brièvement en faisant couler de l'eau sur la lame, puis déposez quelques gouttes de lugol et laisser en contact une minute puis rincez à l'eau. Une décoloration rapide à l'alcool 95° pendant 30 secondes est effectuée, la lame est lavée à nouveau par l'eau, colorée à la fuchsine pendant 1 minute, puis rincée à l'eau et séchée. Les lames sont observées au microscope optique avec une goutte d'huile à immersion. Les bactéries Gram- avec une enveloppe externe se décolorent lorsqu'elles sont lavées à l'alcool et se colorent à nouveau en rose par la fuchsine, tandis que les bactéries Gram+ conservent la coloration violette du cristal violet.

4.2. Caractérisation biochimique et métabolique des isolats bactériens

a. Test catalase

Le test catalase a été réalisé en déposant sur une lame une goutte d'eau oxygénée (10 volumes) dans laquelle un petit prélèvement de la colonie a été dissocié au paravent. L'isolat examiné a été considéré catalase positive lorsqu'un dégagement gazeux a été observé (Marchal et al., 1991).

b. Test oxydase

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence ou non du complexe enzymatique IV : cytochrome oxydase dans la chaine respiratoire des bactéries. Le test oxydase a été réalisé en déposant une colonie de l'isolat bactérien sur un papier filtre stérile imbibé de réactif oxydase N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénilènediamine dihydrochloride (PDA) dilué à 1% dans l'eau. Les colonies colorées en violette, révèlent la présence et l'expression de cette enzyme, ont été considérées oxydase positive (Steel, 1961).

c. Production de l'acide indole-3-acétique (AIA)

La production d'acide indole-3-acétique (AIA) par les isolats a été mesurée par la méthode de Battini et al. (2016). Les cellules ont été cultivées dans des tubes contenant 4 mL de LB supplémenté de 1 mg/mL de L-tryptophane et incubés pendant 5 jours à 30°C sous agitation 150 rpm. Après centrifugation à 7500 g pendant 10 min, 1 mL du surnageant a été mélangé avec 2 mL du réactif Salkowski (1,2% de $FeCl_3$ dans 7,9 M de l'acide sulfurique) (Glickmann and Dessaux, 1995). Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 30 min et la production de l'AIA a été mesurée par spectrophotomètre à 530 nm.

d. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)

La production de l'acide cyanhydrique a été testée selon la méthode de Lorck (1948). Les boites contenant 4,4 g/L glycérine, 3 g/L Bouillon Tryptone Soja (TSB) et 17 g/L agar ont été inoculées par les cellules d'un isolat bactérien, puis un papier filtre stérile (9 cm de diamètre) a été imprégné d'une solution de couleur jaune composé de : 0,5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium et déposé sur le couvercle de la boite. Un changement de couleur du papier filtre du jaune à l'orange reflète la production de HCN par l'isolat.

e. Production des exopolysaccharides (EPS)

La production d'exopolysaccharides a été détectée selon la procédure décrite par Kaci et al. (2005) sur milieu RCV-saccharose composé de : extrait de levure 0,1 g/L, saccharose 30 g/L et agar 17 g/L. Les boîtes ensemencées avec les inoculums des isolats bactériens ont été incubées à 30°C pendant 7 jours et la formation de gels autour des colonies bactériennes indique la production d'EPS.

f. Solubilisation du phosphate tricalcique ; étude qualitative

La solubilisation du phosphate tricalcique par les isolats bactériens a été évaluée en déposant 10 µL de la culture bactérienne sur le milieu NBRIP agar (National Botanical Research Institue Phosphate) composé de : glucose 10 g/L, $Ca(PO_4)_2$ 5 g/L, $MgCl_2$ $6H_2O$ 2,5 g/L, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0,25 g/L, KCl 0,2 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 g/L et agar 17 g/L, le pH du milieu est ajusté à 7 (Nautiyal, 1999). La capacité de solubilisation du phosphate a été évaluée après 5 jours d'incubation à 30°C par la formation d'un halo autour des colonies et elle est déterminée par l'Indice de Solubilisation de Phosphate (ISP) (Premono et al., 1996). L'ISP est calculé selon la formule :

$$ISP = \frac{(Diamètre\ de\ la\ colonie + Diamètre\ du\ halo)}{Diamètre\ de\ la\ colonie}$$

g. Solubilisation du phosphate tricalcique ; étude quantitative

La solubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu NBRIP liquide a été mesurée selon la technique décrite par Fiske and Subbarow (1925). Dans des flacons de 100 mL contenant 50 mL du milieu NBRIP, 100 µL de l'inoculum bactérien ont été ajoutés, puis incubés pendant 5 jours à 30°C sous agitation à 150 rpm. Après centrifugation d'un volume de 5 mL à 10000 rpm pendant 10 min, 500 µL du surnageant ont été mélangés avec 5,5% d'acide trichloracétique, incubés pendant 10 min, ensuite 500 µL d'un réactif colorant (mélange de 40 mL de 1,5% de molybdate d'ammonium dans 5,5% d'acide sulfurique avec 10 mL de 2,7% de sulfate de fer dans l'eau distillée) ont été ajoutés. La courbe d'étalonnage a été préparée avec KH_2PO_4 et le phosphomolybdate produit a été mesuré par spectrophotomètre à 700 nm.

4.3. Résistance à la salinité

Pour évaluer la capacité des isolats bactériens à résister à la salinité, les cellules ont été ensemencées sur milieu LB agar additionné de concentrations croissantes de NaCl allant de 4% à 20%. Après 48 h incubation à 30°C, les isolats ont été marqués positifs ou négatifs *vis-à-vis* du stress selon leur capacité à former ou non des colonies en présence des différentes concentrations de NaCl.

4.4. Résistance aux antibiotiques

Les isolats bactériens ont été également testés pour leur résistance aux antibiotiques en se basant sur la technique de diffusion sur disque d'agar (Rota et al., 2004). Pour ce faire, des disques d'antibiotiques (érythromycine, chloramphénicol, pénicilline, augmentin, kanamycine, métronidazole, ceftazidime et gentamicine) ont été déposés sur les boites de LB agar préalablement ensemencées par l'inoculum bactérien. Les boites ont été ensuite incubées à 30°C pendant 48 h et le diamètre des zones inhibitrices a été mesuré.

4.5. Test d'antagonisme

L'existence d'une éventuelle activité antagoniste entre les isolats bactériens a été montrée par la méthode de diffusion sur disque d'agar (Rota et al., 2004). L'activité antagoniste des isolats a été évaluée en étalant l'inoculum d'un isolat bactérien sur une boîte de LB agar avec un écouvillon stérile puis en déposant sur un disque stérile (6 mm de diamètre) 10 µL de l'inoculum d'un autre isolat. Après incubation à 30°C pendant 24 h, l'inhibition ou l'activité antagoniste se manifeste par la présence de zones claires autour des disques. Elle est considérée comme positive lorsque le diamètre de la zone claire est supérieur à 1 mm (Allouche et al., 2010).

5. Identification moléculaire des isolats bactériens

Pour déterminer la position taxonomique des six isolats bactériens performants nous avons procédé à l'identification moléculaire. Le principe de cette technique est basé sur l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) du gène de l'ARNr 16S en utilisant les amorces fD1et rP2 qui amplifient un fragment d'ADN de 1500 pb (Weisburg et al., 1991). Ces séquences sont ensuite comparées aux séquences disponibles dans les bases de données. Le

programme utilisé est BLAST NR 2.9.0+ via le National Center for Biotechnology Information (NCBI).

La définition moléculaire des états de genre, impose une homologie de l'ADNr 16S soit supérieure ou égale à 97%. Un pourcentage d'homologie de 99% permet l'identification de l'espèce, alors qu'un pourcentage inférieur à 97% d'homologie ne permet pas son identification (Drancourt et al., 2004).

5.1. Extraction rapide de l'ADN

Pour chaque isolat bactérien, après une nuit de culture à 30°C, un volume de 1 mL a été centrifugé à 8000 rpm pendant 5 min. Le culot a été remis en suspension dans 100 µL d'eau distillée et la suspension a été soumise à un choc thermique par congélation à -20°C pendant 30 min suivi d'un chauffage à 95°C pendant 3 min. Après centrifugation à 12 000 rpm pendant 5 min, 2 µL de surnageant contenant l'ADN a été utilisé pour la réaction PCR.

5.2. Amplification PCR

Les amorces universelles, fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et rP2 (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') ont été utilisées pour amplifier un fragment de l'ADNr 16S des six isolats bactériens (Weisburg et al., 1991). La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume final de 20 µL contenant 0,5 µM de chaque amorce, 200 µM de chaque dNTP, 0,2 U/µL de la Taq polymérase, 1,5 mM $MgCl_2$ et 2 µL d'échantillon d'ADN dans un tampon polymérase Taq 1x. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Techne Genius, Cambridge, UK). Le mélange a été dénaturé à 94°C pendant 5 min, ensuite 35 cycles de PCR ont été réalisés par dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 55°C pendant 30 s et extension à 72°C pendant 1 min 30 s. A la fin du dernier cycle, le mélange a été incubé à 72°C pendant 10 min permettant d'achever les synthèses de l'ADN en cours. L'amplification a été par la suite analysée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% afin de séparer les amplicons. 2 µL du produit PCR a été mélangé avec 2 µL d'une solution de charge avant de le déposer dans les puits du gel d'électrophorèse. Cette solution est composée d'un marqueur de mobilité (bleu de bromophénol) à 2,5 µL/mL qui permet de suivre la migration et d'un alourdisseur (glycérol) à 300 µL/mL pour entrainer l'ADN au fond des puits du gel. La migration a été réalisée à l'aide d'un générateur de courant 50 V et la visualisation a été faite à l'aide d'un transilluminateur à UV.

5.3. Séquençage et analyse bioinformatique des séquences

Le séquençage a été réalisé à la Cité de l'Innovation de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès, Maroc qui utilise un séquenceur de type ABI 3130 (Applied Biosystems). La séquence partielle du gène de l'ARNr 16S a été comparée à la séquence complète disponible dans la base de données GenBank en utilisant BLAST du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les numéros d'accession des séquences ont été attribués par GenBank.

5.4. Construction de l'arbre phylogénétique

L'arbre phylogénétique a été construite à l'aide de l'algorithme Neighbor Joining (NJ) via le logiciel MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11) (Tamura et al., 2021), où les séquences ont été alignées par ClustalW accessible dans MEGA11.

6. Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes sélectionnées ont été conservées dans des boites de LB agar supplémenté par 300 mg/L Cr(VI) et stockées à +4°C pendant un mois. Pour la conservation à long terme des bactéries, 800 µL de la préculture de la souche bactérienne préparée dans LB bouillon a été mélangée dans des tubes eppeindorfs stériles avec 200 µL de glycérol et conservés à -20°C et à -80°C.

7. Mesure de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne a été mesurée par trois méthodes :

- La concentration cellulaire a été déterminée après préparation de dilutions à partir d'une solution mère d'un inoculum bactérien, puis un volume de 100 µL a été étalé sur gélose LB. Les boîtes sont ensuite incubée pendant 48 h à 30°C et la charge bactérienne est comptée et exprimé en Unités Formant Colonies (UFC) dont le nombre de colonies doit être compris entre 30 et 300.
- Elle peut être également déterminé par mesure de la turbidité de la suspension bactérienne à une densité optique (DO) de 600 nm à l'aide du spectrophotomètre.
- Le poids sec est déterminé par filtration des suspensions bactériennes sur une membrane stérile de 0,45 µm préalablement séchée à 105°C et pesée. La membrane est placée dans une boîte de Pétri en verre et placée dans une étuve à 105°C pendant 48 h, puis pesée après refroidissement.

III. Optimisation de différents paramètres environnementaux pour la réduction du Cr(VI) et la croissance bactérienne

La concentration du Cr(VI) restant dans le milieu a été déterminée par la méthode colorimétrique au S-diphénylcarbazide (DPC) telle que décrite par Greenberg et al. (1992). A des intervalles de temps précis, des échantillons des cultures bactériennes ont été prélevés, centrifugés à 7000 rpm pendant 10 min et la concentration de Cr(VI) est déterminée dans le surnageant en mesurant l'intensité de la couleur rose-violette au spectrophotomètre à 540 nm.
La croissance bactérienne a également été suivie en mesurant la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Specuvisi UV/VIS Spectrophotometer, n° RE1701008).

1. Effet de différents paramètres environnementaux sur la réduction du Cr(VI)

1.1. Effet du pH

L'étude de l'effet de la concentration en ions hydrogène est crucial, vu que les variations du pH influencent directement la croissance bactérienne et donc l'efficacité de réduction du Cr(VI). L'effet du pH initial ; 5, 6, 7, 8 et 9 a été étudié dans des erlenmeyers contenant 50 mL du bouillon LB additionné de 100 mg/L de Cr(VI) et ensemencé avec 100 µL d'une préculture d'une nuit (DO = 0.9 - 1.015). Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 48 h sous agitation 150 rpm. Des témoins abiotiques ont été réalisés dans les mêmes conditions.

1.2. Effet de la température

L'effet de la température sur la croissance bactérienne et la réduction du Cr(VI) a également été évalué dans 50 mL du LB liquide additionné de 100 mg/L de Cr(VI) et inoculé avec 100 µL de la préculture, tout en faisant varier la température de 25, 30, 35, 40 et 45°C et en ajustant le pH optimal de chaque souche. Les erlenmeyers ont été incubés pendant 48 h sous agitation à 150 rpm.

1.3. Effet de la concentration initiale du Cr(VI)

L'effet de la concentration initiale du Cr(VI) sur la croissance bactérienne et l'efficacité de la réduction du Cr(VI) dans un bouillon LB additionné de concentrations croissantes du Cr(VI)

de 50, 100, 200 et 300 mg/L et ensemencé avec 100 µL de préculture ont été recherchés. Les conditions optimales de pH et de température de chaque souche ont été respectées. Des témoins abiotiques ont été préparés dans les mêmes conditions.

1.4. Effet de la présence d'autres métaux lourds

L'impact de la présence d'autres éléments métalliques sur le taux de réduction a été étudié dans le bouillon LB supplémenté avec 100 mg/L de Cr(VI) et 100 mg/L des métaux ; Pb^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} et Fe^{3+} ou 10 mg/L du Cd^{2+} et Hg^{2+}. Les erlenmeyers ont été incubés à température optimale pendant 24 h sous agitation à 150 rpm.

1.5. Effet des accepteurs d'électrons

Étant donné que la réduction du Cr(VI) peut être influencée par la présence d'accepteurs d'électrons qui sont abondamment présents dans l'environnement. L'effet du sulfate (Na_2SO_4), du nitrate (NH_4NO_3), du calcium ($CaCl_2$) et du carbonate (Na_2CO_3) a été étudié à une concentration de 10 mM dans 50 mL du bouillon LB additionné de 100 mg/L Cr(VI). Les cultures ont été incubées pendant 24 h sous agitation.

1.6. Effet des donneurs d'électrons

L'effet des sources de carbone agissant comme donneurs d'électrons a été étudié. Pour cela, le glucose, le glycérol, le citrate, l'acétate et le benzoate ont été ajouté séparément à une concentration de 10 mM dans milieu minimum M9 (Na_2HPO_4, $2H_2O$ 6,4 g/L, KH_2PO_4 1,5 g/L, NaCl 0,25 g/L, 0,5 g/L NH_4Cl, 0,1 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgSO_4$) additionné de 100 mg/L de Cr(VI) pendant 7 jours d'incubation a été étudié.

1.7. Effet des protéines et de la viabilité cellulaire

Pour tester si la réduction du Cr(VI) par les isolats bactériens est un processus à médiation enzymatique, les cellules ont été traitées avec des dénaturants protéiques en utilisant 0,5% de dodécylsulfate de sodium (SDS), 10 mM de nitrate d'argent ($AgNO_3$) suivie d'une dénaturation thermique à 100°C pendant 20 min. Alors que l'effet de certains inhibiteurs métaboliques tels que l'azoture de sodium (NaN_3) et le ferrocyanure de potassium trihydraté ($K_4Fe(CN)_6$ $3H_2O$) a été également étudié à une concentration de 10 mM dans bouillon LB additionné de 100 mg/L de Cr(VI) et inoculé avec 100 µL de la préculture d'une nuit. Le taux

de réduction du Cr(VI) a été mesuré après 24 h d'incubation aux conditions optimales de pH et de température.

2. Etude de la réduction du Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées

Dans l'environnement, les bactéries existent rarement sous forme planctonique, mais elles sont souvent immobilisées dans des agrégats ou des biofilms. La bioremédiation des effluents industriels contaminés au Cr(VI) par les cellules libres peut être difficile en raison du contact direct métal-bactérie. Pour protéger les cellules, l'immobilisation des bactéries pour l'élimination du Cr(VI) présente des avantages par rapport aux cellules planctoniques en raison de leur ; stabilité, facilité de régénération, possibilité de réutilisation, séparation solide-liquide plus facile et colmatage minimal dans les systèmes continus. De plus, les cellules immobilisées conservent leur capacité de décontamination après plusieurs traitements (Viera et al., 2003). Ainsi, une comparaison de l'efficacité de réduction du Cr(VI) entre les cellules libres et immobilisées dans le milieu LB liquide a été effectuée.

Au cours de cette étude, nous avons cherché l'effet de trois facteurs ; **i**) Nature du milieu de culture (milieu renouvelé ou non), **ii**) contaminations répétées (100 mg/L de Cr(VI) et **iii**) état des cellules (libres et immobilisées) sur l'efficacité de réduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes sélectionnées.

2.1. Réduction du Cr(VI) par les cellules libres

Des expériences de réduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes ont été réalisées par ensemencement de 100 µL de la suspension cellulaire, en phase exponentielle de croissance ($DO_{600\ nm}$= 0.9 - 1.015), dans 50 mL de bouillon LB additionnées de 100 mg/L de Cr(VI). Ensuite, Les flacons ont été incubés sous agitation à 150 rpm aux conditions optimales du pH et de la température.

2.2. Réduction du Cr(VI) par les cellules immobilisées

A partir d'une culture exponentielle ($DO_{600\ nm}$= 0.9 - 1.015), les cellules ont été centrifugées à 7000 rpm pendant 10 min, le culot a été lavé deux fois et remis en suspension dans 15 mL d'eau physiologique stérile. Pour la construction des biobilles (mélange cellules-alginate) ; l'alginate de sodium à 1,5% a été préparé en dissolvant 0,45 g d'alginate dans 15 mL d'eau distillée et stérilisé à 121°C pendant 15 min. Après refroidissement, la solution d'alginate a été

bien mélangée avec 15 mL de la suspension bactérienne, puis introduite dans une seringue stérile de 5 mL pour construire les biobilles dans des conditions stériles. Les billes sont ensuite immergées dans une solution de $CaCl_2$ à 0,1 M, préparée en dissolvant 0,555 g de $CaCl_2$ dans 50 mL d'eau distillée stériles. Après gélification, les billes sont lavées deux fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les cellules non polymérisées et les débris (Joutey et al., 2016).

Les expériences de réduction du Cr(VI) par les cellules immobilisées ont été réalisées en ajoutant les biobilles dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de bouillon LB additionné de 100 mg/L de Cr(VI). Les flacons ont été incubés sous agitation à 150 rpm dans des conditions optimales de température et de pH. La concentration réduite du Cr(VI) a été mesurée toutes les 24 h d'incubation.

2.3. Effet de la contamination répétée et du milieu sur la réduction du Cr(VI)

Afin d'évaluer la performance des cellules libres et immobilisées dans l'élimination de la contamination répétée de 100 mg/L de Cr(VI) en bouillon LB renouvelé et non renouvelé, des aliquotes ont été prélevées toutes les 48 h ce qui équivaut à un cycle et pendant 6 cycles continus. Des témoins abiotiques ont été préparés dans les mêmes conditions (Joutey et al., 2016). Pour les expériences de réduction réalisées dans le milieu renouvelé, les cellules libres et immobilisées ont été centrifugées à 7000 rpm pendant 10 min, lavées à l'eau distillée stérile puis remises en suspension dans le bouillon LB fraîchement préparé.

IV. Etude des mécanismes d'élimination du Cr(VI) par les souches bactériennes

Afin de déterminer les mécanismes impliqués par chaque souche bactérienne dans l'élimination du Cr(VI), une étude plus approfondie a été appliquée.

I. Dans un **premier temps** : une étude de l'adsorption du Cr(VI) à la surface cellulaire par microanalyse de la biomasse bactérienne avant et après contact avec le Cr(VI) à l'aide de la Microscopie Electronique à Balayage couplé à la Spectrométrie d'Energie Dispersive des Rayons X (MEB-EDX), analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) et la modélisation des isothermes d'adsorption ont été réalisées.

II. Dans un **second temps** : une étude visant à caractériser la nature de la réduction : enzymatique ou non, constitutive ou inductible, à localiser l'activité réductrice et à déterminer le poids moléculaire de la chromate réductase a été effectuée.

1. Etude de l'adsorption du Cr(VI) sur la surface cellulaire

La capacité de réduction du Cr(VI) en Cr(III) par les souches bactériennes est généralement précédée par l'adsorption du Cr(VI) à la surface cellulaire en faisant intervenir les groupements fonctionnels (Opperman and van Heerden, 2008a).

1.1. Modélisation des isothermes d'adsorption

Comme leur nom l'indique, les isothermes n'ont de sens qu'à température constante, ce ne sont pas des modèles dynamiques car ils ne dépendent pas du temps. Les isothermes permettent de déterminer la capacité d'adsorption du solide pour un soluté donné ; ils permettent donc de démontrer si la purification est faisable ou non. Les isothermes sont des courbes reliant la quantité de polluants adsorbés par unité de masse de matériau (**q_e**) et la concentration de polluants restant en solution (**C_e**) (Giles et al., 1960 ; Djelloul, 2014).

L'isotherme d'équilibre a été réalisée dans des flacons erlenmeyers contenant 50 mL de bouillon LB additionné d'une concentration initiale en Cr(VI) **C_i** allant de 25 à 300 mg/L et ensemencé avec une biomasse bactérienne de 0,4 g/L. La concentration du Cr(VI) non adsorbée **C_e** est mesurée par dosage spectrophotométrique.

Pour éliminer l'influence de la quantité d'adsorbant, **q_e** est normalisée par la masse des cellules utilisées et calculée comme suit :

$$qe = \frac{(Ci - Ce)\ X\ V}{M}$$

Où : **V** : volume de la solution et **M** : masse d'adsorbant.

Afin d'étudier la voie d'adsorption et la relation d'équilibre entre le sorbant et le sorbate, il est nécessaire de concevoir des isothermes d'adsorption appropriées. Les isothermes prédisent les paramètres appropriés et le comportement du sorbant *vis-à-vis* différents systèmes de sorption. Les isothermes communément employées sont l'isotherme de Langmuir et de Freundlich.

a. Isotherme de Langmuir

L'isotherme d'adsorption de Langmuir est un modèle largement utilisé pour déduire les performances de différents sorbants et il repose sur l'hypothèse que l'adsorption des sorbates se produit sur une surface homogène par sorption monocouche sans interaction entre les molécules adsorbées (Hamdaoui and Naffrechoux, 2007 ; Farouq and Yousef, 2015). L'équation de l'isotherme de Langmuir sous sa forme linéaire est exprimée comme suit :

$$\frac{Ce}{qe} = \frac{Ce}{qm} + \frac{1}{KL \times qm}$$

Où : K_L : constante d'adsorption liée à l'énergie d'adsorption (L/mg)

q_m : capacité maximale d'adsorption (mg/g)

C_e : concentration en métal à l'équilibre (mg/L)

L'isotherme de Langmuir peut être exprimée en termes de paramètre d'équilibre R_L, qui est une constante sans dimension, considérée comme un paramètre d'équilibre de séparation (Dada et al., 2012), qui peut être calculée avec l'équation suivante :

$$RT = \frac{1}{1 + (1 + KL \times Ci)}$$

Où C_i : concentration initiale de Cr(VI) (mg/L) et K_L : constante de Langmuir

La valeur de R_L donne une idée sur la nature de l'adsorption : défavorable si $R_L > 1$, linéaire si $R_L=1$, favorable si $0 < R_L < 1$ et irréversible si $R_L = 0$.

b. Isotherme de Freundlich

Le modèle d'isotherme de sorption de Freundlich explique le processus d'adsorption dans des surfaces hétérogènes (Hamdaoui and Naffrechoux, 2007 ; Farouq and Yousef, 2015). La distribution exponentielle des sites actifs et leurs énergies s'exprime par l'équation suivante (Bilgili et al., 2012) :

$$\text{Log } qe = \text{LogKF} + \frac{1}{n} \text{ LogCe}$$

Les valeurs de K_F et n sont calculées à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine du tracé linéaire **Log q_e** versus **Log C_e**. K_F est une constante qui dépend du nombre total des sites d'adsorption et 1/n donne une indication sur l'intensité d'adsorption.

La méthode des moindres carrés linéaires et les équations transformées linéairement ont été largement appliquées pour corréler les données de sorption où : 1/n est un paramètre d'hétérogénéité, plus ce paramètre est petit, plus l'hétérogénéité attendue est grande. Si l'adsorption est bonne $0,1 < 1/n < 0,5$, modérée si $0,5 < 1/n < 1$ et faible si $1/n > 1$ (Dada et al., 2012).

1.2. Analyse par Microscopie Electronique à Balayage associée à la Microanalyse par Energie Dispersive de rayons (MEB-EDX)

Le principe de la spectrométrie à dispersion d'énergie (EDX) couplée à la microscopie électronique à balayage (MEB) est basé sur la détermination de la composition chimique de la surface examinée. Il consiste à analyser les rayons X générés par un échantillon placé sous le faisceau d'électrons du MEB. Le rayonnement émis lors de l'interaction entre les rayons X et le matériau de l'échantillon est transcrit sous la forme d'un spectre, où apparaissent des pics d'intensité variable, caractéristiques des éléments métalliques ou minéraux présents sur la surface.

La compréhension du mécanisme d'élimination du Cr(VI) par les six souches bactériennes nécessite l'observation de la morphologie des cellules avant et après contact avec le métal par le MEB, ainsi que l'analyse des éléments présents sur la paroi bactérienne par EDX. Pour cela, les cellules ont été cultivées en absence (cellules contrôles) et en présence de 100 mg/L du Cr(VI) pendant une nuit, centrifugées à 7000 rpm pendant 20 min à 4°C, lavées deux fois et resuspendues dans une solution stérile de nitrate de potassium (pH 7,0). Les cellules ont été ensuite déposées sur des lames adhésives conductrices séchées à température ambiante et recouvertes d'or pour une caractérisation par MEB-EDX (JSM-IT500HR) à la Cité de l'Innovation de l'USMBA, Fès Maroc.

1.3. Analyse par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Le principe de la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier est basé sur l'absorption du rayonnement infrarouge par l'échantillon à analyser. Cet échantillon peut être à l'état gazeux, solide ou liquide. Elle permet, via l'absorption des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, de déterminer la présence de certaines fonctions chimiques présentes dans la matière. Ce principe repose sur l'absorption du rayonnement infrarouge lorsque la longueur d'onde (énergie) du faisceau est égale à l'énergie vibratoire de la molécule. La gamme

infrarouge entre 400 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} correspond à la gamme d'énergie vibratoire de la plupart des molécules (infrarouge moyen) (Gueye, 2016).

Les modifications des groupes fonctionnels de la surface cellulaire de chaque souche étudiée avant et après contact avec le Cr(VI) ont été déterminées par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF). Les six souches bactériennes ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus, après centrifugation, le culot a été lavé deux fois avec un tampon phosphate stérile et remis en suspension dans le même tampon. Un volume de 20 µL de la suspension bactérienne a été étalé sur une lame de verre et séché pendant une nuit à 50°C. Les spectres ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF - VERTEX 70 - BRUKER) dans la gamme comprise entre 400 à 4000 cm^{-1} à une résolution de 4 cm^{-1} à la Cité de l'Innovation de l'USMBA, Fès Maroc (Bahafid et al., 2013b).

2. Etude de la réduction du Cr(VI) par les souches bactériennes

2.1. Réduction par les cellules au repos « Resting cells »

Les expériences de cellules au repos ont été réalisées en cultivant les cellules des isolats bactériens pendant une nuit dans 50 mL de LB en absence et en présence de 10 mg/L Cr(VI). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 7000 rpm pendant 20 min à 4°C, le culot récupéré est lavé deux fois avec un tampon phosphate de potassium à 0,05 M et remis en suspension dans 10 mL du même tampon (pH 7,0). Le Cr(VI) est ajouté à des concentrations de 10 mg/L et 25 mg/L. Les tubes ont été vortexés brièvement et incubés à température optimale de chaque souche sous agitation à 150 rpm. Après 6 h d'incubation, les tubes sont centrifugés et la concentration résiduelle en Cr(VI) est mesurée dans le surnageant. Les cellules tuées thermiquement à 100°C pendant 30 min ont servi de contrôle (Soni et al., 2013).

2.2. Réduction par les cellules perméabilisées « Permeabilized cells »

Les cellules perméabilisées ont été cultivées comme indiqué précédemment. Après croissance, les cellules ont été centrifugées et le culot a été rincé deux fois avec le tampon Tris-HCl à 10 mM et remis en suspension dans le même tampon (pH 7,2). Pour assurer la perméabilisation cellulaire, le toluène 0,01% et le triton X-100 0,2% (v/v) ont été ajoutés à un volume de 9,9 mL de la suspension cellulaire, puis vortexés pendant 10 min. Le Cr(VI) a été ajouté à 10 mg/L et 25 mg/L, les tubes ont ensuite été incubés pendant 6 h à température optimale sous agitation à 150 rpm. Le contrôle des cellules perméabilisées a été réalisé en

traitant thermiquement les cellules préparées dans les mêmes conditions à 100°C pendant 30 min (Thacker et al., 2006).

2.3. Réduction par les fractionnements cellulaires

Les extraits cellulaires des six isolats bactériens ont été préparés en cultivant les cellules, en présence de 10 mg/L et en l'absence du Cr(VI), pendant une nuit pour atteindre la phase exponentielle de croissance. Les cellules ont été centrifugées à 7000 rpm pendant 20 min à 4°C et le surnageant correspondant à la fraction extracellulaire a été stérilisé par filtration sur un Filtre à membrane Nitrocellulose 0,45 µm, tandis que le culot contenant les cellules a été rincé deux fois et remis en suspension dans 10 mL de tampon Tris-HCl 10 mM et pH 7,2. Pour assurer le fractionnement, les cellules ont été placées dans la glace et lysées pendant 10 et 20 min (Ultrasound SB-120DT, fréquence 40 KHz). Ensuite, centrifugées à 7000 rpm pendant 30 min à 4°C, le surnageant qui est la fraction cytosolique a été stérilisé par filtration (0,22 µm), tandis que le culot correspondant à la fraction membranaire a été remis en suspension dans le même volume de tampon Tris-HCl.
Le Cr(VI) a été ajouté dans les tubes des fractions extracellulaires, membranaires et intracellulaires à une concentration de 25 mg/L, puis incubés à température optimale pendant 6 h avec agitation à 150 rpm. Le témoin a été produit dans les mêmes conditions et détruit thermiquement à 100°C pendant 30 min (Joutey et al., 2016).

2.4. Expression de l'activité chromate réductase

Pour déterminer la manière d'expression de l'activité chromate réductase, qu'elle soit inductible ou constitutive, les cultures bactériennes des six isolats des trois tests précédents ont été réalisées en présence de 10 mg/L du Cr(VI) et en son absence.

2.5. Dosage des protéines

La fraction extracellulaire, cytosolique ou membranaire qui a donné une efficacité de réduction élevée a été soumise à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, mais au préalable les concentrations en protéines ont été normalisées, où elles ont été quantifiées selon la méthode de Lowry et al. (1951).
À un volume de 0,1 mL de protéine, 0,1 mL de la solution F (1% SDS et 0,1 M NaOH) et 1 mL de réactif C composé de 50 mL de réactif A (2% de Na_2CO_3 dans 0,1 M NaOH) et 1 mL de réactif B (0,5% $CuS0_4.5H_2O$ dans 1% de tartrate de sodium ou de potassium) est ajouté.

Bien mélanger et laisser reposer pendant 10 minutes ou plus à température ambiante. 0,1 mL de réactif E (Folin-Ciocalteu dilué au 1/3) est ajouté très rapidement et mélangé en une seconde ou deux. Après 30 minutes ou plus d'incubation, l'absorbance de l'échantillon est lue dans le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm. La gamme d'étalonnage a été préparée avec le sérum de l'albumine bovine.

2.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

La SDS-PAGE a été réalisée dans un gel de polyacrylamide d'une dimension de 10 cm x 8 cm et d'une épaisseur de 1,5 mm. Le gel à 12% a été préparé à partir d'une solution mère de 30% d'acrylamide et de 0,8 % de N,N'-bis-méthylène acrylamide. La concentration finale dans le gel de séparation était : Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) et SDS 0,1%. Les gels ont été chimiquement polymérisés en ajoutant 0,025% de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et 10% de persulfate d'ammonium (APS). Tandis que le gel de concentration d'acrylamide à 4%, de 1 cm de long, est composé d'une concentration finale de Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) et de SDS à 0,1% et polymérisé chimiquement de la même manière que le gel de séparation. Le tampon de migration (pH 8,3) contenait du Tris 0,025 M, de la glycine 0,192 M et du SDS à 0,1%.

Les échantillons ont été préparés avec un rapport 2:1, où 2/3 de l'extrait protéique et 1/3 du tampon de charge, ce dernier est composé de Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), 2% de SDS, 10% de glycérol, 5% de 2-mercaptoéthanol et 0,001 % de bleu de bromophénol comme colorant. Les puits ont été chargés avec des aliquotes de 25 µL d'échantillon équivalant à 25 µg de protéine et d'étalons du poids moléculaire suivant ; ß-galactosidase (116,0 kDa), albumine sérique bovine (66,2 kDa), ovalbumine (45,0 kDa), lactate déshydrogénase (35,0 kDa), REase Bsp98l (25 kDa), ß-lactoglobuline (18, 4 kDa) et lysozyme (14,4 kDa) qui ont été utilisés.

Le gel est passé à 125 V pendant 3 h à température ambiante et une fois la migration est terminée, le gel est coloré pendant 30 min avec du bleu de Coomassie ensuite décoloré (Laemmli, 1970).

V. Traitement d'effluent des tanneries contaminé par le Cr(VI)

Situées au cœur de la ville de Fès, les tanneries existent depuis des siècles, témoignant de l'importance de l'artisanat et du travail du cuir au Maroc. L'augmentation de la demande en cuir et maroquinerie a entraîné une augmentation de la production, qui consomme plus d'eau

et génère plus d'effluents toxiques, causant ainsi de véritables problèmes pour la faune et la flore et par conséquent pour la santé humaine.

Le traitement de ces effluents est donc une nécessité, c'est pourquoi nous avons choisi d'appliquer un traitement biologique, économique, écologique et efficace de ces rejets à l'aide de nos six bactéries performantes, séparées en consortiums.

1. Prélèvement de l'effluent

Les échantillons d'effluents de tanneries ont été prélevés de manière aseptique à partir de la zone industrielle Ain Nokbi de la ville de Fès, située à 34.0659915 Lat. Nord et à 4.950160 Long Ouest (**Figure 13**), au mois de mars 2021. Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans une glacière à 4°C pour éviter toute prolifération bactérienne.

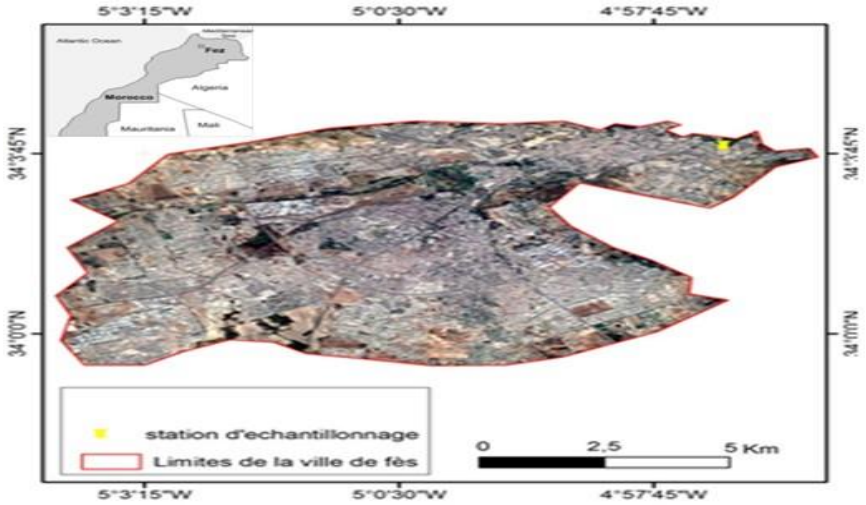


Figure 13 : Station de prélèvement des effluents des tanneries de la zone industrielle Ain Nokbi Fès Maroc.

2. Caractérisation physico-chimique de l'effluent des tanneries

Les échantillons d'effluents de tanneries collectés ont été analysés dans le laboratoire en trois répétitions pour les différents paramètres physico-chimiques, afin de définir l'intensité et le degré de pollution organique et inorganique. Divers paramètres ont été mesurés à savoir ; pH, conductivité électrique (CE), matières en suspension (MES), demande chimique en oxygène (DCO), sulfates (SO_4^{2-}), nitrates (NO_3^-), azotes Kjeldahl (NTK) et la concentration du Cr(VI) et autres éléments métalliques par ICP-AES. Le **tableau 9** résume les méthodes analytiques et les équipements utilisés lors de ces mesures selon les protocoles décrits par Abouzaid and Duchesne (1984) et Rodier (2009).

Ces paramètres ont été mesurés avant et après traitement de l'effluent par les souches bactériennes sélectionnées, séparées et en consortiums.

Tableau 9 : Méthodes d'analyse des paramètres physico-chimiques des effluents de tanneries.

Paramètre	Méthodes analytiques et équipement	Unité
pH	Mesuré par un multi-paramètre (type CONSORT C535, Turnhout, Belgium)	1-12
Conductivité électrique (CE)	Mesuré par un multi-paramètre (type CONSORT C535, Turnhout, Belgium)	µs/cm
Matières en suspension (MES)	Filtration d'un volume de l'effluent sur une membrane de 0,45 µm	mg/L
Demande chimique en oxygène (DCO)	Oxydation en milieu acide par l'excès de dichromate de potassium en présence du sulfate de fer et d'ammonium à 148°C	mg d'O_2 /L
Sulfates (SO_4^{2-})	Précipitation des sulfates en milieu acide chlorhydrique sous forme de sulfates de baryum. Dosage colorimétrique par spectrophotométrie. (Specuvisi UV/VIS Spectrophotometer, n° RE1701008)	mg/L
Nitrates (NO_3^-)	Salicylate de sodium. Dosage colorimétrique par spectrophotométrie (Specuvisi UV/VIS Spectrophotometer, n° RE1701008)	mg/L
Azote Kjeldahl (NTK)	Mesuré par minéralisation suivie d'une distillation	mg/L
Cr(VI)	Méthode colorimétrique au DPC. Dosage par spectrophotométrie (Specuvisi UV/VIS Spectrophotometer, n° RE1701008)	mg/L
Eléments métalliques	Spectromètre à émission atomique avec plasma à couplage inductif (ICP-AES) à la Cité de l'innovation à l'USMBA	mg/L

3. Traitement des effluents de tanneries par les isolats bactériens séparés et en consortiums

Afin d'éliminer les matières en suspension, très abondantes, l'effluent a été d'abord filtré sur papier Wattman 9 cm, puis filtré sur un filtre de nitrocellulose de 0,22 µm pour éviter l'interaction due aux microorganismes et aux spores indigènes. Le filtrat a ensuite été réparti dans des erlenmeyers à raison de 1 L, contaminé par 50 mg/L du Cr(VI) et ensemencé avec 5 mL de la suspension bactérienne de chaque isolat ($DO_{600\ nm}$ = 0,9 - 1,015), séparément.

Pour le traitement des effluents par les consortiums bactériens, les isolats qui ont une faible ou absence d'activité antagoniste entre eux ont été utilisés en consortium, dont chacun est composé de trois isolats bactériens. L'inoculation des effluents de tanneries a été réalisée comme décrit ci-dessus. Les erlenmeyers ont été incubés entre 3 jours (pour les consortiums bactériens) et 5 jours (pour les isolats bactériens séparés) à température optimale sous agitation à 150 rpm. Des témoins abiotiques/négatifs (effluent non ensemencé) ont été réalisés dans les mêmes conditions. Après chaque 24 h, des aliquotes ont été prélevés pour déterminer la concentration du Cr(VI) restante dans l'effluent.

VI. Contribution à la valorisation de l'effluent traité par irrigation des plantes

Au cours des dernières décennies et partout dans le monde, les ressources en eau disponibles s'amenuisent en raison de facteurs naturels et d'activités humaines qui aggravent la situation. Ces pressions sur les ressources en eau augmentent, principalement du fait des actions humaines, notamment la concurrence croissante des industries pour les ressources en eau et la pollution métallique générée.

De ce fait, les effluents industriels de tanneries traités avec nos souches bactériennes sont principalement destinés à l'irrigation. Mais d'abord, il faut tester si les isolats bactériens sont capables ou non de produire une réaction d'hypersensibilité chez les plantes, en d'autre terme vérifier si les isolats bactériens sont phytopathogènes.

Dans le cas où les bactéries ne sont pas pathogènes pour les plantes, les effluents traités seront utilisés pour irriguer les plantes de tomates. Ensuite, un certain nombre des paramètres de croissance, physiologiques et biochimiques seront mesurés.

1. Test d’hypersensibilité sur les feuilles de tabac

La réaction d'hypersensibilité (RH) a été déterminée sur les feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum cv. Xanthi*). Un volume de 200 µL de la suspension bactérienne de chaque isolat a été infiltré sur les feuilles de tabac à l'aide d'une seringue stérile sans aiguille. De l'eau distillée stérile a été utilisée comme contrôle négatif et des souches phytopathogènes ; *Agrobacterium tumefaciens* et *Allorhizobium vitis* ont été utilisées comme deux contrôles positifs. Les plantes de tabac ont été conservées et le développement de la nécrose a été noté sur une période de 5 jours (Habbadi et al., 2017).

2. Irrigation des plantes de tomates

Des graines de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) préalablement désinfectées avec de l'eau de javel à 10% ont été mises à germer dans des plateaux alvéoles et irriguées avec de l'eau potable pendant 3 semaines pendant le mois d’avril à mai. Les plantules ont ensuite été transplantées dans des pots contenant 160 g de sol et irriguées avec l'effluent traité par les isolats séparés et les consortiums bactériens. Les témoins arrosés par l’effluent non traité et par l'eau potable ont été également préparés dans les mêmes conditions. Les pots ont été incubés sous serre à une température de 27 ± 3°C pendant 40 jours et pour chaque traitement trois plantes ont été plantées. Des mesures de certains paramètres de croissance, physiologiques et biochimiques ont été réalisées.

3. Mesure des paramètres de croissance, physiologiques et biochimiques

Des feuilles des plantes de tomates ont été sélectionnées au hasard pour mesurer certains paramètres :

- **Traits de croissance** : longueur des parties aériennes et racinaires, poids de matière fraîche et sèche.
- **Traits physiologiques** : fluorescence de la chlorophylle (Fv/Fm), teneur en pigments chlorophylliens.
- **Traits biochimiques** : teneur en proline, sucres solubles et protéines.
- **Dosage des éléments métalliques** dans les feuilles des plantes.

3.1. Trait de croissance

a. Mesure de la longueur et du poids

Afin de déterminer l'effet des effluents traités, des effluents non traités et de l'eau du robinet sur la croissance des plantes de tomates, les longueurs des parties aériennes et racinaires, ainsi que les poids des matières fraîches et sèches ont été mesurés.

3.2. Traits physiologiques

a. Mesure de la fluorescence de la chlorophylle

La fluorescence de la chlorophylle a été mesurée avec un fluorimètre portable (OS-30p, OptiScience Inc., Hudson, NH, USA). Les feuilles intactes ont été adaptées à l'obscurité pendant au moins 20 minutes à l'aide de pinces à feuilles. La fluorescence maximale dans la lumière (F_m) a été mesurée après application d'une impulsion de lumière actinique saturante de 3000 μmol m^{-2} s^{-1} pendant 0,8 s. Les paramètres F_0 et F_m ont ensuite été utilisés pour calculer la fluorescence variable ($F_v = F_m - F_0$) et l'efficacité quantique maximale du PSII (F_v/F_m). Ces mesures ont été prises vers midi sur une feuille exposée en plein soleil.

b. Teneur en pigments chlorophylliens

La teneur en pigments chlorophylliens a été déterminée par les deux méthodes suivantes :

- L'indice SPAD a été enregistré à l'aide d'un compteur SPAD portable (SPAD 502 Plus, Konica Minolta). Ces mesures ont été également réalisées vers midi sur une feuille exposée en plein soleil.

- Le dosage a été réalisé à partir de coupes de feuilles saines et matures de 20 mg, qui ont été introduites dans des tubes à hémolyse en verre recouverts d'une feuille d'aluminium. Les feuilles sont ensuite immergées dans 1,4 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO), le tout est incubé à 65°C pendant une heure. A la fin de la réaction la feuille perd sa couleur verte et devient jaunâtre. Après incubation, 0,6 mL de DMSO est ajouté et l'absorbance de l'extrait de chlorophylle à 470 nm, 645 nm et 663 nm a été mesurée avec un spectrophotomètre (Richardson et al., 2002). Les équations suivantes sont utilisées :

Chlorophyle a (mg/g MF) = **[12,7 × A663) - (2,69 × A645)] × (V/1000 × M)**

Chlorophyle b (mg/g MF) = **[(22,9 × A645) - (4,68 × A663)] × (V/1000 × M)**

Chlorophyle total (mg/g MF) = **[(20,08 × A645) + (8,02 × A663)] × (V/1000 × M)**

Caroténoides + Xantophylles (mg/g MF) = [(1000 × A470) - (1,90 × Chla) - (63,14 × Chlb) / 214] × (V/1000 × M)

Où : **V** : volume de l'extrait (mL) et **M** : masse de l'échantillon (g).

3.3. Traits biochimiques

a. Teneur en proline

Une masse de 200 mg de matière fraîche a été broyée dans 5 mL d'acide sulfosalicylique 3% (w/v), centrifugée à 5000 rpm pendant 10 min, le surnageant est ensuite récupéré et le volume est complété à 5 mL avec de l'acide sulfosalicylique 3%. À un volume de 2 mL de l'extrait, on ajoute 2 mL de ninhydrine (préparée en dissolvant 2,5 g dans 60 mL d'acide acétique glacial et 40 mL d'acide phosphorique 6 M) et 2 mL d'acide acétique glacial. Les tubes ont été placés dans un bain-marie bouillant pendant 1 h, puis placés dans de l'eau glacée pendant 5 min pour arrêter la réaction. Après addition de 3 mL de toluène, le mélange est vortexé et laissé 5 min, puis l'absorbance est lue à 520 nm. La gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution de proline (Bates et al., 1973).

b. Teneur en sucres solubles

La teneur en sucres solubles est déterminée en broyant à froid 200 mg de matériel foliaire frais dans 5 mL de tampon phosphate de potassium à 50 mM pH 7,5 puis centrifugé à 5000 rpm pendant 15 min (Erice et al., 2007). 0,1 mL de surnageant est mélangé avec 3 mL d'anthrone à 0,15% (préparé dans l'acide sulfurique à 75%). Les tubes ont été placés dans un bain-marie à 90°C pendant 10 min, après refroidissement l'absorbance a été lue à 625 nm. La gamme d'étalonnage a été préparée avec du glucose (Yemm and Willis, 1954).

c. Teneur en protéines

La teneur en protéines a été déterminée selon le protocole de Lowry et al. (1951). 200 mg de la matière foliaire fraîche a été broyée à froid dans 1 mL de tampon phosphate de sodium à 100 mM pH 7,2, le mélange est centrifugé à 12 000 rpm pendant 15 min et le dosage est effectué comme décrit ci-dessus (paragraphe : IV.2.5).

3.4. Dosage des éléments métalliques

Afin de déterminer et de comparer la concentration des éléments métalliques présents dans les feuilles de plantes de tomate irriguées par les effluents traités, non traités et par l'eau de robinet, une analyse de ces éléments par ICP-AES a été réalisée.

VII. Méthodes analytiques

1. Dosage du Cr(VI)

Le dosage du Cr(VI) a été réalisé par la méthode colorimétrique au diphénylcarbazide (DPC) qui réagit avec les ions Cr(VI) en milieu fortement acide et donne une coloration violette.

1.1. Préparation des solutions du dosage

La solution du diphénylcarbazide a été préparée en mélangeant 0,25 g de 1,5-diphénylcarbazide dans 100 mL d'acétone grade analytique.
La solution d'acide sulfurique 6 M a été préparée en versant 60 mL de H_2SO_4 dans 40 mL d'eau distillée.

1.2. Dosage du Cr(VI) en milieu liquide

Pour déterminer la concentration de Cr(VI) restante dans les milieux de cultures et dans les effluents, la méthode colorimétrique au S-diphénylcarbazide (DPC) a été appliquée (Greenberg et al., 1992 ; Thacker et al., 2006). A des intervalles de temps spécifiques, des échantillons ont été prélevés dans des tubes, centrifugés à 7000 rpm pendant 10 min et la concentration de Cr(VI) a été déterminée dans le surnageant. Dans des tubes an verre, à un volume de 200 µL d'échantillon, 330 µL de H_2SO_4 (6 M) et 400 µL de DPC (0,25%) ont été ajoutés, le volume est ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée et une coloration violette apparaît en présence de Cr(VI) qui est mesurable au spectrophotomètre à 540 nm (Specuvisi UV/VIS Spectrophotometer, n° RE1701008).
La gamme d'étalonnage a été préparée de la même manière avec des solutions étalons de 10, 25, 50, 75, 100 et 150 mg/L de Cr(VI).

2. Dosage du chrome total et des éléments métalliques

2.1. Dans le sol

La teneur en éléments métalliques dans les échantillons du sol a été déterminée par analyse à l'ICP-AES à la Cité de l'Innovation de l'USMBA Fès Maroc. Avant analyse, les échantillons ont été préalablement séchés dans une étuve à 40°C pendant au moins 16 h, ensuite broyés et tamisés pour obtenir des particules de diamètre compris entre 2 et 250 µm. La minéralisation des échantillons a été réalisée sur une quantité de 0,5 g du sol dans 6 mL d'acide chlorhydrique et 2 mL d'acide nitrique (eau régale). Le mélange a été chauffé dans un bloc chauffant à 120°C pendant 2 h. Le minéralisât obtenu a été ensuite ajusté à 50 mL par l'eau distillée. Une filtration des échantillons doit alors être effectuée avant l'analyse par ICP-AES (Alsac, 2007).

2.2. Dans les effluents

Les échantillons liquides doivent être centrifugés à 7000 rpm pendant 10 min et un volume de 50 mL de surnageant a été introduit dans des tubes additionnés d'acide nitrique à 2% afin de conserver les échantillons pour analyse par ICP-AES.

2.3. Dans les plantes

Après récolte, les feuilles des plantes ont été séchées dans une étuve pendant 48 h à 80°C. Après broyage, 0,25 g a été minéralisé par ajout de 4 mL d'acide nitrique. Le mélange a été laissé pendant une nuit pour la prédigestion, puis chauffé dans un bloc chauffant à 120°C pendant 2 h. Le volume a été ajusté à 20 mL avec de l'eau distillée et filtré pour analyse par ICP-AES (Davies et al., 2001 ; Bragato et al., 2006).

VIII. Analyses statistiques

Au cours de cette étude, toutes les expériences ont été réalisées en trois répétitions et les résultats ont été soumis à des analyses statistiques.

Les moyennes, les écarts-types des moyennes, les différences significatives de Fisher (LSD) (avec un niveau de confiance de 95,0 %), l'Analyse en Composantes Principales (ACP), les analyses de corrélation et les régressions linéaires ont été calculées à l'aide du logiciel XLSTAT version 2016.02.28451 et du logiciel Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies, Inc., Virginie, États-Unis).

Résultats et Discussion

I. Caractérisation des sites d'étude et d'échantillonnage

Les environnements pollués par les métaux lourds sont généralement caractérisés par la présence de divers métaux toxiques, ce qui nécessite de tester la résistance des bactéries aux métaux et donc de sélectionner des souches multirésistantes utilisables pour la bioremédiation des sites contaminés par les métaux lourds. Partant de ce postulat, nous avons choisi d'isoler des bactéries résistantes aux métaux provenant de mines abandonnées de la région de Taza-Maroc. Dans un premier temps, les échantillons du sol ont fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique (**Tableau 10**) afin de déterminer le degré de la pollution métallique par analyse à l'ICP-AES.

Tableau 10 : Propriétés physico-chimiques des échantillons du sol des mines et du sol de référence (**SR** : sol de référence) comparées avec les valeurs réglementaires.

Paramètres	**S1**	**S2**	**S3**	**SR**	**Norme AFNOR***
T (°C)	20	19	20	23	-
pH	6,86 ± 0,025	7,76 ± 0,032	6,72 ± 0,04	7,14 ± 0,03	-
EC 25°C (dS/m)	0,18 ± 0,005	0,135 ± 0,007	1,93 ± 0,03	0,12 ± 0,001	-
Ca (mg/Kg)	>1000	>1000	>1000	>1000	-
Na (mg/Kg)	475,12	290,133	200,00	250,68	-
Cr (mg/Kg)	20,83	14,936	27,27	2,29	150
Pb (mg/Kg)	>1000	>1000	>1000	540,83	50-300
Cu (mg/Kg)	186,32	988,35	422,6	41,77	50-140
Fe (mg/Kg)	>1000	>1000	>1000	>1000	-
Zn (mg/Kg)	964,86	>1000	654,80	510,4	150-300

T : température, **pH** : potentiel Hydrogène, CE : conductivité électrique, **Ca** : calcium, **Na** : sodium, **Cr** : chrome, **Pb** : plomb, **Cu** : cuivre, **Fe** : fer, **Zn** : zinc.

*Valeurs limites dans les sols agricoles selon la norme AFNOR U44-41 (Baize, 2000).

Les résultats des analyses physico-chimiques des échantillons du sol montrent que les sols étudiés ont un pH neutre. Les deux premiers sites sont classés dans la catégorie des sols non salins et le troisième est salé avec une valeur de la conductivité électrique de 1,93 ds/m.

L'analyse par ICP-AES a montré la présence d'un mélange de métaux avec des concentrations élevées dépassant les normes. En effet, les teneurs en ETM varient selon l'élément métallique et selon le site de prélèvement. Les concentrations en plomb, cuivre, fer et zinc dans les 3 sites dépassent la norme AFNOR. Ces résultats sont reliés, puisque les sites de prélèvement sont des anciennes mines de plomb, de cuivre et de fer. L'existence élevée de ces métaux est due à l'activité minière, qui est l'un des principaux polluants du sol et de l'eau. En effet, cette industrie génère généralement d'énormes quantités de métaux lourds. Ces résultats sont comparables à ceux de plusieurs auteurs (Mendez et al., 2008 ; Baize, 2009 ; Smouni et al., 2010 ; Hodomihou et al., 2016 ; Kouakou et al., 2019) qui ont montré que les teneurs élevées de métaux dans les sols varient en fonction de l'élément métallique, du type de sol et des sources de contamination.

II. Isolement, caractérisation et identification des bactéries résistantes au Cr(VI) et aux autres métaux lourds

1. Isolement de bactéries résistantes au Cr(VI)

Les colonies bactériennes développées sur milieu LB agar ; différenciées selon leurs caractéristiques morphologiques ; sont purifiées par repiquages successifs sur milieu LB agar jusqu'à l'obtention des isolats purs. Le nombre total d'isolats bactériens obtenus après purification est de 201 isolats bactériens, qui ont ensuite été évalués pour leur capacité à tolérer le Cr(VI) (100 - 1000 mg/L). **Tableau 11** présente le nombre d'isolats par mine d'étude.

Tableau 11 : Nombre d'isolats bactériens par site d'étude.

	Mine 1	**Mine 2**	**Mine 3**
Nombre des isolats bactériens	81	67	53
Nombre total		**201**	

2. Test de résistance aux métaux

Les isolats bactériens purifiés qui ont montré une résistance remarquable au Cr(VI) ont été davantage caractérisés. Ces isolats sont au nombre de six et ils sont nommés CRB en référence aux « Bactéries réductrices/résistantes au chrome » (Chromium Reducing/Resistant Bacteria) (Somasundaram et al., 2009). Les isolats ainsi sélectionnés sont évalués pour leur

résistance au Cr(VI) et aux autres métaux lourds en milieu gélosé et en milieu liquide, afin de déterminer la variation du pouvoir de résistance en fonction du métal et selon l'état du milieu (solide ou liquide). Les **tableaux 12** et **13** montrent la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque isolat par rapport aux métaux testés dans le milieu de culture LB solide et liquide.

Les résultats du **tableau 12** montrent que les isolats bactériens sont résistants à des fortes concentrations de métaux lourds sur LB agar et que le degré de tolérance ou de résistance varie d'un isolat à l'autre et selon le métal testé. Il est clair que nos six isolats sélectionnés sont dotés d'une multirésistance aux métaux lourds avec un degré de résistance comme suit :

Fe > Pb > Ni > Cr(VI) > Co > Cu > Zn > Cd > Hg. Il faut noter que le Cd et le Hg sont les métaux les plus toxiques pour tous les isolats bactériens.

La CMI de tous les isolats *vis-à-vis* au Cr(VI) est supérieure à 700 mg/L. Ces résultats sont intéressants en comparaison avec d'autres recherches, où la CMI de *Staphylococcus haemolyticus* isolée par Arshad et al. (2019) est de 500 mg/L Cr(VI), celle de *Bacillus* sp. et *Bacillus cereus* isolées par Tan et al. (2020) est de l'ordre de 420 mg/L et 405 mg/L, respectivement. *E. coli* ATCC 25922 isolée par Bhardwaj et al. (2018) tolère 77 mg/L de Cr(VI), alors que *Serratia proteamaculans* a montré une résistance de 500 mg/L au Cr(VI) (Joutey et al., 2014). Concernant les métaux les plus toxiques, des résultats similaires ont été trouvés par Zahoor and Rehman (2009) pour *Staphylococcus capitis*, dont l'ordre de toxicité était le suivant : Ni > Pb > Zn > Cu > Cd > Hg, indiquant que ces deux derniers métaux sont hautement toxiques pour plusieurs espèces bactériennes.

Tableau 12 : Concentration minimale inhibitrice des six isolats bactériens aux différents métaux sur milieu LB solide (mg/L).

Isolat / Métal	CRB-1	CRB-2	CRB-3	CRB-4	CRB-5	CRB-6
Cr(VI)	800	800	900	900	900	800
Pb	2100	2400	2200	2500	2200	2300
Zn	500	500	800	700	500	600
Cu	700	700	900	700	600	500
Co	600	800	900	800	700	500
Ni	800	1000	800	1000	1300	900
Fe	2500	2800	2500	2700	2500	2400
Cd	40	70	50	50	40	30
Hg	40	50	40	30	40	20

En comparant ces résultats avec ceux du **tableau 13**, on constate que le degré de tolérance ou de résistance des isolats aux métaux diminue dans le milieu liquide par rapport au milieu solide. Cette diminution est due au changement d'état des cellules, fixées et en suspension, où les cellules dans un milieu liquide sont en contact direct et permanent avec le métal contrairement au milieu solide. Par conséquent, la résistance des cellules en milieu gélosé est plus élevée qu'en milieu liquide.

Tableau 13 : Concentration minimale inhibitrice des six isolats bactériens aux différents métaux sur milieu LB liquide (mg/L).

Isolat / Métal	CRB-1	CRB-2	CRB-3	CRB-4	CRB-5	CRB-6
Cr(VI)	700	600	700	800	800	700
Pb	1600	1900	1600	1800	1600	1500
Zn	300	400	500	500	300	400
Cu	500	700	700	700	500	500
Co	300	600	600	500	400	300
Ni	500	700	600	700	1000	700
Fe	1700	2000	1700	2000	1800	1000
Cd	25	50	20	50	25	10
Hg	20	50	25	25	25	10

Ces résultats sont similaires à ceux d'autres chercheurs, où Cruz-Vega et al. (2008) ont constaté que la tolérance microbienne aux métaux en milieu solide était différente de celle en milieu liquide. Les travaux de Hassen et al. (1998) ont également confirmé que les CMI des bactéries *vis-à-vis* des métaux en milieu solide étaient plus élevées que celles enregistrées en milieu liquide.

Généralement la résistance au Cr(VI) ou sa réduction en Cr(III) par une bactérie n'est pas liée à la concentration en chrome de l'environnement d'où elle provenait. Cela montre que dans les environnements de stress métallique, les bactéries subsistent dans des microenvironnements avec différentes concentrations de métaux en fonction de leur capacité à tolérer et à développer des mécanismes de résistance (Morais et al., 2011). Ces mécanismes peuvent être des canaux d'efflux des métaux, des plasmides de résistance, l'absorption par adsorption, la méthylation de l'ADN et la biotransformation des métaux en forme moins toxique soit directement par des enzymes spécifiques, soit indirectement par des métabolites cellulaires (Camargo et al., 2003).

3. Caractérisation morphologique

Sur la base des tests préliminaires de résistance au Cr(VI) et aux autres ETM, les six isolats bactériens (CRB-1, CRB-2, CRB-3, CRB-4, CRB-5 et CRB-6) qui se sont révélés les plus résistants ont été retenus pour la suite de ce travail. Les colonies de ces isolats développées sur milieu LB agar sont différenciées selon leurs caractères culturaux (taille, couleur, opacité, contour, élévation…etc.). Le **tableau 14** présente le site d'isolement et les caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopiques) de ces isolats.

Selon les résultats, on constate que les trois premiers isolats (CRB-1, CRB-2 et CRB-3) sont isolés de la première mine, le 4ème (CRB-4) de la seconde et les deux derniers (CRB-5 et CRB-6) de la troisième. On note également que les six isolats sélectionnés pour leur résistance au Cr(VI) sont à Gram-positifs, une corrélation avec d'autres recherches où ils ont montré que les bactéries à Gram-positifs sont généralement plus résistantes au forte concentration du Cr(VI) que les bactéries à Gram-négatifs (Ross et al., 1981 ; Xu et al., 2015).

Tableau 14 : Sites d'isolement et caractéristiques macroscopiques et microscopiques des six isolats bactériens.

Isolats	Sites	Taille*	Couleur	Forme	Contour	Aspect	Opacité	Elévation	Gram	Forme
CRB-1	S1	Punctiforme	Jaune	Ronde	Régulier	Lisse	Opaque	Convexe	Positif	Cocci
CRB-2	S1	Punctiforme	Orange	Ronde	Régulier	Lisse	Opaque	Convexe	Positif	Cocci
CRB-3	S1	Non punctiforme	Beige	Complexe	Non régulier	Ridé	Semi transparente	Plate	Positif	Bacilles
CRB-4	S2	Non punctiforme	Beige	Complexe	Non régulier	Ridé	Semi transparente	Plate	Positif	Bacilles
CRB-5	S3	Punctiforme	Beige	Ronde	Régulier	Lisse	Opaque	Convexe	Positif	Cocci
CRB-6	S3	Non punctiforme	Blanche	Ronde	Régulier	Lisse	Opaque	Convexe	Positif	Cocci

* **punctiforme** : diamètre de la colonie < 1 mm, **non punctiforme** : diamètre de la colonie > 1 mm.

4. Caractérisation biochimique et métabolique des isolats bactériens

Les résultats de la caractérisation biochimique et la production de certains métabolites par les différents isolats bactériens sélectionnés sont présentés dans le **tableau 15**. Les résultats négatifs ne signifient pas que les isolats ne produisent pas les métabolites attendus mais que ceux-ci ne sont pas détectés par les méthodes utilisées dans cette étude.

Tableau 15 : Résultats de certaines activités biochimiques et métaboliques des isolats bactériens.

Activité / Isolats	Catalase	Oxydase	NaCl (%)	HCN	EPS	AIA (µg/ml)	ISP	Phosphore soluble (µg/ml)
CRB-1	+	-	14	+	+	42,28	2,16	54,81
CRB-2	+	-	14	+	-	97,92	2,04	67,22
CRB-3	+	+	16	+	+	10,46	2,15	44,37
CRB-4	+	+	10	-	+	12,65	2,23	97,24
CRB-5	+	-	12	+	+	48,78	2,41	79,12
CRB-6	+	-	16	-	+	38,12	2,69	101,57

Les résultats des tests biochimiques ont montré que tous les isolats sont positifs au test de la catalase. Certains ont enregistré une oxydase positive (CRB-3 et CRB-4), tandis que pour d'autres étaient négative.

A la réduction des ressources en eau, qui est un facteur majeur de la diminution de la croissance et de la productivité des plantes, s'ajoute la salinité des sols. Dans ce cadre, nous avons cherché à étudier la tolérance des isolats au NaCl pour les utiliser comme des PGPR afin d'améliorer la résistance des plantes à la salinité. Selon les résultats, les six isolats étudiés sont halotolérants voire hypertolérants, cas de CRB-3 et CRB-6 (16% NaCl), avec une variation du niveau de résistance. Cette forte tolérance pourrait être due à la synthèse de facteurs de résistance et d'adaptation aux stress environnementaux (Finkel and Kolter, 1999). Les valeurs obtenues sont supérieures à celles rapportées par Tank et al. (2010), où les trois isolats de *Pseudomonas* pouvaient tolérer un stress de 8% de NaCl, après quoi aucune croissance n'a été observée. Cependant, une résistance de 20% de NaCl a été rapportée par Sapre et al. (2018) chez *Klebsiella* sp.

La recherche chez les isolats étudiés de certains caractères favorisant la croissance des plantes est nécessaire pour leur éventuelle utilisation dans des procédés agricoles. Certains de ces caractères tels que la production d'acide cyanhydrique (HCN), d'exopolysaccharides (EPS), d'acide indole acétique (AIA) et la solubilisation du phosphore sont détectés dans nos isolats bactériens. La capacité à produire du HCN qui est un métabolite secondaire utilisé comme biocide par les PGPR pour inhiber les champignons phytopathogènes (Raaijmakers et al.,

2009) a été trouvée chez tous les isolats sauf chez CRB-4 et CRB-6. Parmi 16 PGPR étudiées par Chenniappan et al. (2019), un seul isolat été capable de produire l'HCN.

Les résultats obtenus montrent que les cinq isolats CRB-1, CRB-3, CRB-4, CRB-5 et CRB-6 sont capables de produire des exopolysaccharides. Les EPS sont des biopolymères libérés lors de la croissance microbienne et impliqués dans la formation du biofilm. Ces polysaccharides formés principalement du glucose, du galactose et du rhamnose possèdent des propriétés physico-chimiques et biologiques spécifiques et innovantes à haut potentiel biotechnologique (génie environnemental, agroalimentaire, santé, …etc.) (Lelchat, 2014). De plus, les EPS bactériens améliorent la croissance des plantes en situation de stress hydrique en formant des biofilms hydrophiles (contenant 97% d'eau) au niveau des racines (Rossi et al., 2012). Les EPS jouent également un rôle important dans la résistance des bactéries aux métaux lourds, où ces biopolymères chargés négativement interviennent dans la biosorption des cations métalliques (Pal and Paul, 2008).

L'AIA est une auxine produite par certaines espèces bactériennes et joue un rôle très important dans l'amélioration de l'absorption de l'eau, des minéraux et des nutriments, améliorant ainsi l'enracinement et induisant la prolifération bactérienne sur les racines par exsudation racinaire (Glick, 2010). Les résultats ont montré que les 6 isolats cultivés en milieu additionné de tryptophane étaient capables de produire de l'AIA. La production maximale a été enregistrée chez l'isolat CRB-2 (97,92 µg/ml) par rapport aux autres isolats, tandis que la quantité minimale de la production d'AIA a été signalée pour l'isolat CRB-3 (10,46 µg/ml). En effet, plusieurs espèces bactériennes auraient la capacité de produire cette hormone essentielle au développement racinaire des plantes (Lambrecht et al., 2000 ; Tirry et al., 2018). De plus, de nombreuses bactéries résistantes aux métaux lourds étaient capables de produire des phytohormones telles que l'auxine AIA même dans des conditions stressantes (Dell'Amico et al., 2008 ; Chiboub et al., 2016). Par exemple, Sheng et al. (2008) ont montré que la promotion de la croissance des plantes de *Brassica napus* observée sous le stress du plomb après l'inoculation des plantes avec *Pseudomonas fluorescens* était attribuée à la production et à l'excrétion d'AIA par la bactérie.

Le phosphore est l'un des principaux macronutriments essentiels à la croissance et au développement des plantes. Cependant, la concentration de phosphore soluble dans le sol est généralement très faible (Zhu et al., 2011). Plusieurs études ont montré que les PGPR sont responsables de la solubilisation du phosphore insoluble (Hemambika et al., 2013). L'utilisation de ces bactéries comme inoculant peut augmenter fortement l'absorption du phosphore par la plante et par conséquent augmenter le rendement des cultures (Rodriguez et

al., 1999). L'estimation qualitative de la solubilisation du phosphore a été réalisée dans le milieu gélosé NBRIP, où la capacité de solubilisation la plus élevée a été observée avec l'isolat CRB-6 (ISP = 2,69) suivit par CRB-5 et CRB-4 (ISP = 2,41 et ISP = 2,23), respectivement. La capacité de solubilisation du phosphore tricalcique dans le milieu NBRIP liquide par les six isolats varie entre 44,37 et 101,57 µg/ml, dont l'isolat CRB-6 a montré une remarquable activité de solubilisation. Les résultats obtenus par Cherchali et al. (2019) ont montré que la souche *Paenibacillus polymyxa* atteignait sa production maximale du phosphore soluble après cinquante jours d'incubation (279 µg/ml) avec un ISP égal à 1,32. En effet, le pouvoir solubilisant du phosphate d'un isolat sur un milieu solide n'est pas forcément le même en milieu liquide et inversement. L'excrétion d'acides organiques et des ligands organiques a été rapportée comme les facteurs les plus importants de la solubilisation du phosphate (Hemambika and Kannan, 2012 ; Zhu et al., 2018).

5. Résistance aux antibiotiques

Le test d'antibiorésistance a montré que les isolats bactériens sont résistants à certains anibiotiques (ATB) comme l'érythromycine, la gentamicine, le chloramphénicol, l'augmentin et la kanamycine avec un degré de résistance variable et diffère d'un isolat à l'autre. Alors qu'ils sont sensibles au métronidazole, à la ceftazidime et à la pénicilline (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Diamètre d'inhibition en cm après 48 h d'incubation à 30˚C.

ATB / Isolat	ERY (30 mcg)	MET (50 mcg)	CAZ (30 mcg)	GEN (15 mcg)	PG (10U)	CHL (30 mcg)	AUG (20 µg/ 10 µg) (Amoxicilline + acide clavulanique)	KAN (30 µg)
CRB-1	1,1	0	1,6	3,3	1	2,7	2,3	3,5
CRB-2	2,8	0	0	2,5	0	2,4	1,3	1,6
CRB-3	2,4	0	0	3,2	1,2	1,3	2,1	2,1
CRB-4	2,9	0	0	3,1	1,2	1,3	1,5	3,1
CRB-5	2,6	0	0	2,9	0	1,7	1,6	2,9
CRB-6	2,4	0	0	2,8	0	1,8	1,7	2,7

ERY : Erythromycine, **MET** : Métronidazole, **CAZ** : Ceftazidime, **GEN** : Gentamicine, **PG** : Pénicilline G, **CHL** : Chloramphénicol, **AUG** : Augmentin, **KAN** : Kanamycin

Plusieurs gènes codant pour la résistance aux ATB, aux métaux lourds et aux autres éléments toxiques sont localisés sur des éléments génétiques mobiles, facilement échangeables entre

des souches phylogénétiquement éloignées (Branco et al., 2005). Des résultats comparables ont été trouvés par Thacker et al. (2007) lors de l'étude de la multi-résistance de *Brucella* sp. aux métaux lourds et aux antibiotiques.

6. Test d'antagonisme

La recherche d'activité antagoniste entre les six isolats bactériens qualifiés performants est indispensable pour leur utilisation en consortium bactérien pour la bioremédiation des environnements contaminés (El Karkouri et al., 2019). Les résultats des tests d'antagonisme entre ces isolats bactériens sont présentés dans le **tableau 17**. La sélection des isolats potentiellement utilisables en consortium bactérien est basée sur le diamètre du halo d'inhibition, plus ce diamètre est petit, plus il est possible de regrouper les isolats dans un même milieu.

Tableau 17 : Activité antagoniste des six isolats bactériens performants entre eux (diamètre d'inhibition en cm).

Disque / Tapis	CRB-1	CRB-2	CRB-3	CRB-4	CRB-5	CRB-6
CRB-1	-	2,1	0,9	0,7	0,8	0,9
CRB-2	1	-	2,9	2,4	0,9	0,8
CRB-3	-	0,8	-	0,8	-	-
CRB-4	-	-	-	-	-	0,9
CRB-5	-	0,9	1,1	1,2	-	0,8
CRB-6	-	0,9	1,1	1,8	1	-

On constate que certains de ces isolats sont doués d'une activité antagoniste plus ou moins importante. Sur la base des résultats obtenus, nous avons choisi les isolats CRB-1, CRB-3 et CRB-4 pour former le premier consortium (diamètre inférieur à 1), alors que le 2ème consortium contient les cellules des isolats CRB-2, CRB-5 et CRB-6 avec lesquels on va réaliser le traitement d'effluents de tanneries.

7. Identification moléculaire

L'ADN génomique des six isolats bactériens sélectionnés (CRB-1, CRB-2, CRB-3, CRB-4, CRB-5 et CRB-6) a été extrait et amplifié par PCR à l'aide des deux amorces universelles rP2

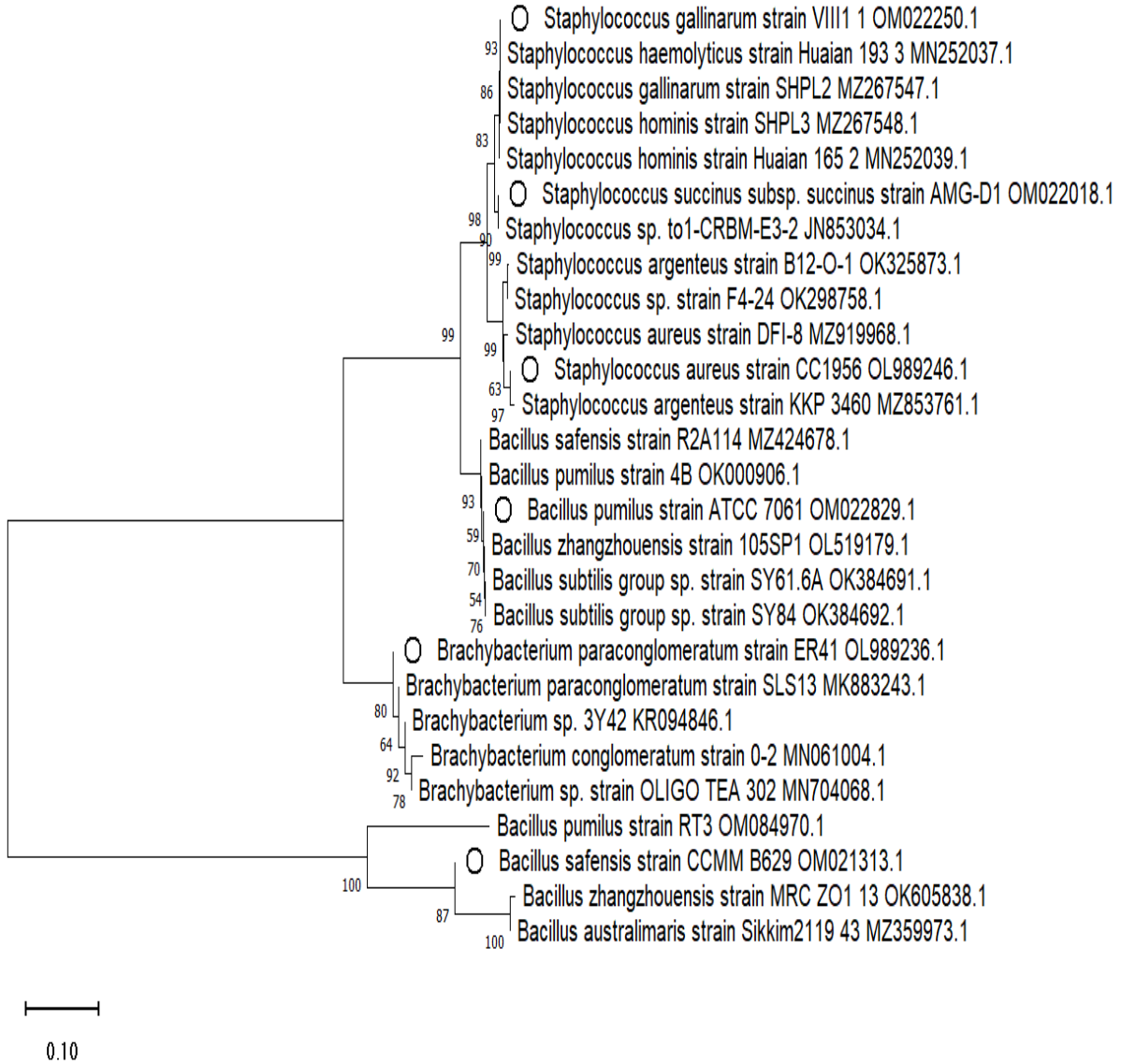
et fD1. Les produits de PCR ont été purifiés et séquencés et les séquences (**Annexe**) ont été analysées et comparées à celles disponibles dans la base de données à l'aide du programme BLAST N, *via* la base de données NCBI. Afin de montrer le degré d'homologie des séquences d'ARN 16S amplifiées avec les autres séquences existantes dans la base de données, des alignements ont été réalisés. Lorsque le pourcentage d'homologie des séquences obtenues est supérieur ou égal à 97%, la détermination du genre est possible, l'identification de l'espèce est faite lorsqu'il est supérieur ou égal à 99%, alors qu'un score inférieur à 97% d'homologie ne permet pas l'identification (Drancourt et al., 2004). Les séquences déterminées dans cette étude sont déposées à la base de données EMBL (Laboratoire européen de biologie moléculaire) /GenBank du NCBI et les résultats de l'identification moléculaire, les numéros d'accession et le pourcentage d'identité sont présentés dans le **tableau 18**.

Tableau 18 : Identification des isolats bactériens par séquençage du gène de l'ARNr 16S.

Isolat	N° d'accession	% d'identité	Taille de l'ADNr 16S amplifié (pb)	Souche (espèce)
CRB-1	OL989236	100	670	***Brachybacterium paraconglomeratum* ER41**
CRB-2	OL989246	100	701	***Staphylococcus aureus* CC1956**
CRB-3	OM021313	>99,83	630	***Bacillus safensis* strain CCMM B29**
CRB-4	OM022829	>99,26	670	***Bacillus pumilus* strain ATCC 7061**
CRB-5	OM022018	>99,73	670	***Staphylococcus succinus* subsp. *Succinus* strain AMG-D1**
CRB-6	OM022250	100	730	***Staphylococcus gallinarum* strain VIII1**

Les résultats obtenus montrent la dominance du genre *Staphylococcus* (3 souches) suivis du genre *Bacillus* (2 souches) puis une souche de *Brachybacterium*. Considérant qu'à notre connaissance, aucune étude de réduction ou d'élimination du Cr(VI) par *Brachybacterium paraconglomeratum* et *Staphylococcus succinus* n'a été réalisée auparavant.

L'arbre phylogénétique, qui retrace les relations taxonomiques et phylogénétiques des six souches séquencées, est réalisé par le logiciel Mega11 (Tamura et al., 2021). Un alignement multiple, par ClustalW disponible dans le présent logiciel, conduit à la création de l'arbre qui ordonne les séquences expérimentales et calcule des distances relatives par rapport à des séquences de référence. Les espèces représentatives de taxons étroitement apparentées



analysées à l'aide de la méthode Neighbor Joining (NJ) sont formées par une matrice de distances, ces distances permettent de regrouper les séquences en paires et de sélectionner celles qui minimisent la longueur totale de l'arbre. Elles sont calculées en rapportant le nombre de sites variables au nombre total de sites en comparant les séquences deux à deux. Cette matrice est représentée sous forme d'un arbre phylogénétique illustré dans la **figure 14**. Des analyses de bootstrap avec 1000 itérations ont été effectuées pour vérifier la robustesse de l'arbre.

Figure 14 : Arbre phylogénétique basé sur le séquençage du gène d'ARNr 16S des six souches bactériennes montrant la relation entre ces bactéries et d'autres ayant un pourcentage de similitude supérieur à 97 % à l'aide de l'algorithme Neighbor Joining (NJ) analysé par le logiciel MEGA11. Les numéros d'accession sont mentionnés après le nom de la souche et les

nombres figurant devant les nœuds indiquent les taux de bootstrap. La barre d'échelle 0,1 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.

III. Optimisation de différents paramètres environnementaux pour la réduction du Cr(VI) et la croissance bactérienne

1. Dénombrement de la biomasse microbienne

Les coefficients de conversion entre la densité optique (600 nm), la concentration cellulaire (UFC/mL) et le poids sec (g/L) des six souches bactériennes sont présentés dans le **tableau 19**. Ces valeurs présentent la charge bactérienne avec laquelle nous avons conduit les expériences de cette étude.

Tableau 19: Coefficient de conversion entre la densité optique (600 nm), la concentration cellulaire (UFC/mL) et le poids sec (g/L) des six souches bactériennes.

	CRB-1	**CRB-2**	**CRB-3**	**CRB-4**	**CRB-5**	**CRB-6**
Densité optique (600 nm)	0,9-1,015	0,9-1,015	0,9-1,015	0,9-1,015	0,9-1,015	0,9-1,015
Concentration cellulaire (UFC/mL)	$4{,}7.10^{8}$	$2{,}9.10^{9}$	$4{,}1.10^{8}$	$1{,}21.10^{8}$	$8{,}6.10^{9}$	$2{,}46.10^{8}$
Poids sec (g/L)	0,408	0,39	0,3	0,312	0,422	0,404

2. Effet de différents paramètres environnementaux sur la réduction du Cr(VI)

L'étude de l'effet des conditions environnementales qui influencent à la fois la croissance bactérienne et l'efficacité de réduction du Cr(VI) est déterminante. Pour cela, nous avons cherché à optimiser et à déterminer l'effet des paramètres suivants : **i**) pH, **ii**) température, **iii**)

concentration initiale en Cr(VI), **iv**) présence d'autres métaux lourds, **v**) donneurs et accepteurs d'électrons, **vi**) inhibiteurs métaboliques et **vii**) dénaturants de protéines.

2.1. Effet de pH

Le pH est l'un des paramètres clés affectant la croissance microbienne, l'activité enzymatique et les sites actifs de liaison des métaux à la surface bactérienne ce qui influence directement l'efficacité de la bioréduction du Cr(VI) (Mangaiyarkarasi et al., 2011). Pour la plupart des souches bactériennes, un pH de 6 à 8,5 s'est avéré optimal pour la réduction du Cr(VI) (Kathiravan et al., 2010). Dans la présente étude, la capacité d'élimination du Cr(VI) et la croissance des six souches bactériennes sous l'effet de différents pH de 5 à 9 ont été étudiés et présentées sur la **figure 15**.

Les résultats obtenus montrent que la croissance et la réduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes étudiées dépendent largement du pH. La réduction s'est avérée efficace à un pH situé entre 6 et 9, avec un optimum entre 7 et 9. La réduction totale de 100 mg/L du Cr(VI) est obtenue à pH 7 pour CRB-3 et CRB-5, à pH 8 pour CRB-1, pour CRB-2 et CRB-6 entre 7 et 8, alors que pour CRB-4 le Cr(VI) est totalement réduit à pH compris entre 7 et 9. En ce qui concerne la croissance bactérienne, il a été noté que la $DO_{600\ nm}$ élevée des six souches bactériennes a été enregistrée à un pH situé entre 7 et 8, confirmant que la réduction du Cr(VI) est strictement liée à la croissance.

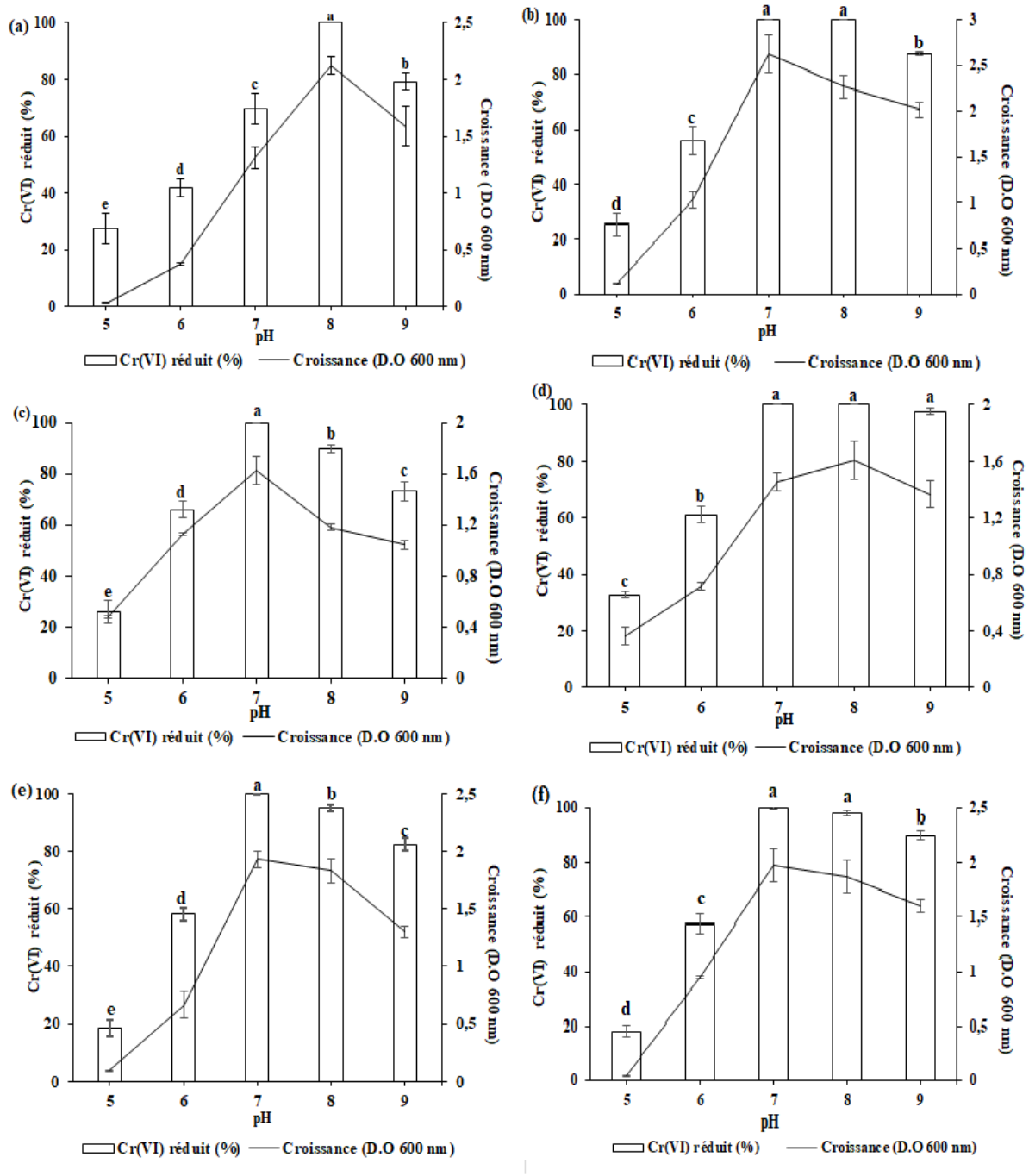


Figure 15 : Effet du pH sur la réduction du Cr(VI) et sur la croissance de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu LB additionné de 100 mg/L de Cr(VI), après 48 h d'incubation à 30°C. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

L’élimination faible du Cr(VI) par les bactéries à pH acide peut s'expliquer d'une part par l'acidité qui affecte négativement la croissance bactérienne et donc les activités métaboliques et la conformation des enzymes (Okeke et al., 2008 ; Murugavelh and Mohanty, 2012). D'autre part par la diminution de l'affinité de liaison entre les ions cationiques du chrome et les groupements fonctionnels chargés négativement de la surface cellulaire. Aussi, l'acidité du milieu affecte l'ionisation des groupements qui sont fortement associés aux protons et donc limite la liaison des ions du chrome (Wierzba and Latała, 2010 ; Ren et al., 2015 ; Mohapatra et al., 2016 ; Wu et al., 2019). De plus, un environnement extrêmement acide peut affecter la structure du transporteur du sulfate microbien et ainsi inhiber la réduction intracellulaire du Cr(VI) (Khattar et al., 2014).

Des résultats comparables ont été trouvés par Tan et al. (2020) lors de l'étude de la réduction du Cr(VI) par *Bacillus* sp. CRB-B1, où la souche était capable d'éliminer les ions chromate dans la plage de pH comprise entre 6 et 9 avec une plus grande efficacité à pH 7, qui était considéré comme le pH optimal pour la croissance bactérienne et pour la réduction du chrome. Pour *Staphylococcus simulans* hautement tolérant au Cr(VI) isolée par Kalsoom et al. (2021), le pH optimal de la réduction du Cr(VI) était 7. De même, Wani et al. (2018b) ont signalé que pour *Penibacillus* sp. le pH 7 est efficace pour la réduction du Cr(VI). La réduction complète de 10 mg/L du Cr(VI) par un consortium bactérien étudié par Ma et al. (2019) a été marquée à pH 8 et pour *Microbacterium* sp. M5 isolée par Kumar and Saini (2019), la réduction complète de 400 mg/L du Cr(VI) a lieu à pH 9.

L'ensemble de ces résultats ont permet de mettre en évidence que les six souches bactériennes étudiées avaient une capacité de réduction du Cr(VI) plus élevée dans des conditions neutres à alcalines par rapport aux conditions acides. De plus, la détoxification du Cr(VI) dans des conditions de pH élevé nécessite une attention car les conditions d'alcalinité élevée sont souvent un problème supplémentaire pour l'élimination du Cr(VI). Par conséquent, la large adaptabilité du pH et l'excellente capacité de réduction du Cr(VI) dans des conditions neutres-alcalines suggèrent que les six souches étudiées *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2), *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus* (CRB-4), *S. succinus* (CRB-5) et *S. gallinarum* (CRB-6) sont susceptibles de bioremédier le Cr(VI) dans diverses conditions environnementales.

2.2. Effet de température

La température est l'un des principaux facteurs qui influencent grandement la croissance et la réduction du Cr(VI). La corrélation entre la température (25°C, 30°C, 35°C, 40°C et 45°C), la croissance bactérienne et la réduction du Cr(VI) est illustrée à la Figure 16. De même, pour le pH, la réduction du Cr(VI) et la croissance varient en fonction de la température et d'une souche à l'autre.

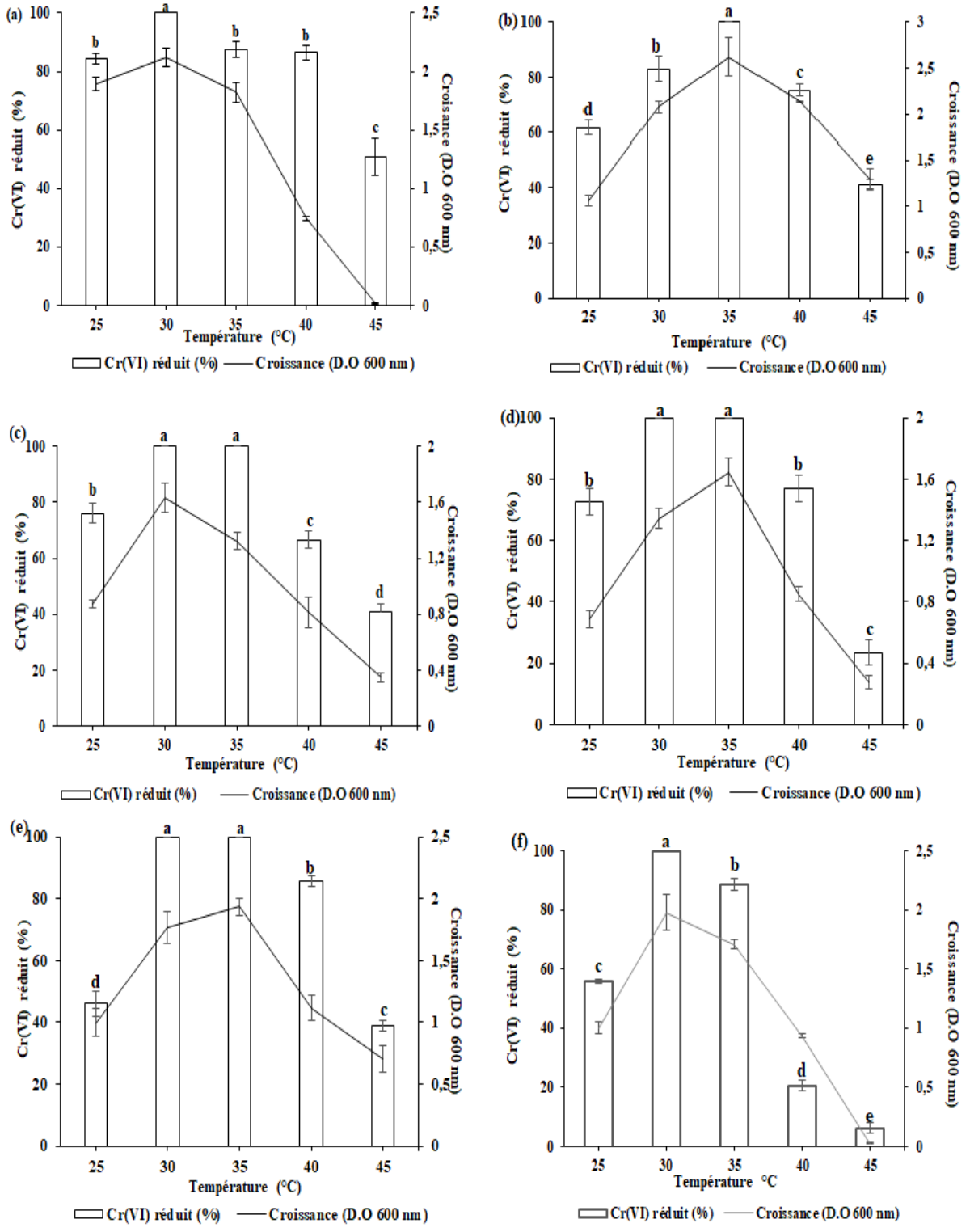


Figure 16 : Effet de la température sur la réduction du Cr(VI) et la croissance de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu LB additionné de 100 mg/L de Cr(VI), après 48 h d'incubation à pH optimal. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

Pour toutes les souches étudiées la réduction du Cr(VI) atteint son maximum à 30°C et/ou à 35°C, de même pour la croissance. Les résultats obtenus montrent que la réduction de 100 mg/L du Cr(VI) est complète à 30°C pour *B. paraconglomeratum* (CRB-1) et *S. gallinarum* (CRB-6), pour *S. aureus* (CRB-2) à 35°C, alors que pour *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus* (CRB-4) et *S. succinus* (CRB-5) elle est totale à 30°C et 35°C. La croissance optimale de *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *B. safensis* (CRB-3) et *S. gallinarum* (CRB-6) a été marquée à 30°C, cependant celle de *S. aureus* (CRB-2), *B. pumilus* (CRB-4) et *S. succinus* (CRB-5) à 35°C. A des températures inférieures ou supérieures à l'optimale, la croissance est ralentie et par conséquent le taux de réduction diminue. Ces résultats confirment que les basses et hautes températures provoquent la perte d'activité réductase, l'altération de la structure membranaire et l'inactivation de la synthèse protéique (Kathiravan et al., 2010 ; Das et al., 2014).

De même, pour *Bacillus* sp. isolée par Dhal et al. (2010) de la mine de chromite Boula d'Odisha, la température préférable était également de 35°C, alors que pour *Bacillus* sp. étudiée par Wani et al. (2018a), la température optimale pour la réduction des ions chrome se situe entre 25°C et 30°C. Tandis que, *Bacillus* sp. CRB-1 isolée par Zhu et al. (2019) a montré un taux de réduction maximal à 42°C qui a été enregistrée comme température optimale. Chez *Staphylococcus* sp. isolée des déchets de traitement des textiles par Mistry et al. (2010), 32°C était la température optimale pour la réduction du Cr(VI). Wani et al. (2018b) ont observés que la réduction optimale du chrome par *Penibacillus* sp. se produit entre 25°C et 35°C, alors qu'à 45°C l'activité de la chromate réductase diminue. Huang et al. (2021a) ont aussi montré que la détoxification du Cr(VI) par *Sporosarcina saromensis* W5 était positivement liée à des températures entre 20°C et 35°C avec un optimum à 35°C. Donc, comme pour le pH, la température affecte également l'ionisation des enzymes ce qui modifie la conformation des protéines et par conséquent agit sur l'activité de la chromate réductase (Zhang and Li, 2011).

2.3. Effet de la concentration initiale du Cr(VI)

Les six souches bactériennes étudiées ont été exposées à des concentrations initiales du Cr(VI) de 50 à 300 mg/L et les résultats de la croissance cellulaire et de la réduction du Cr(VI) sont présentés dans la **figure 17**. Une réduction complète a été obtenue à la faible concentration de 50 mg/L au bout de 24 h pour les six bactéries. Pour la concentration de 100 mg/L, elle est complètement réduite après 48 h par toutes les souches sauf pour *S. gallinarum* (CRB-6) qui la réduit après 96 h. Alors que pour la concentration élevée 200 mg/L, elle a été totalement éliminée par *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus*

(CRB-4) et *S. succinus* (CRB-5) après 120 h d'incubation et pour *S. aureus* (CRB-2) après 148 h, tandis que pour *S. gallinarum* (CRB-6) le taux de réduction atteint 56% après 148 h. Cependant, l'efficacité de réduction est de 90,17%, 89,23%, 67,92%, 74,55%, 83,03% et 41,83% pour *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2), *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus* (CRB-4), *S. succinus* (CRB-5) et *S. gallinarum* (CRB-6), respectivement après 148 h pour la concentration la plus élevée de 300 mg/L.

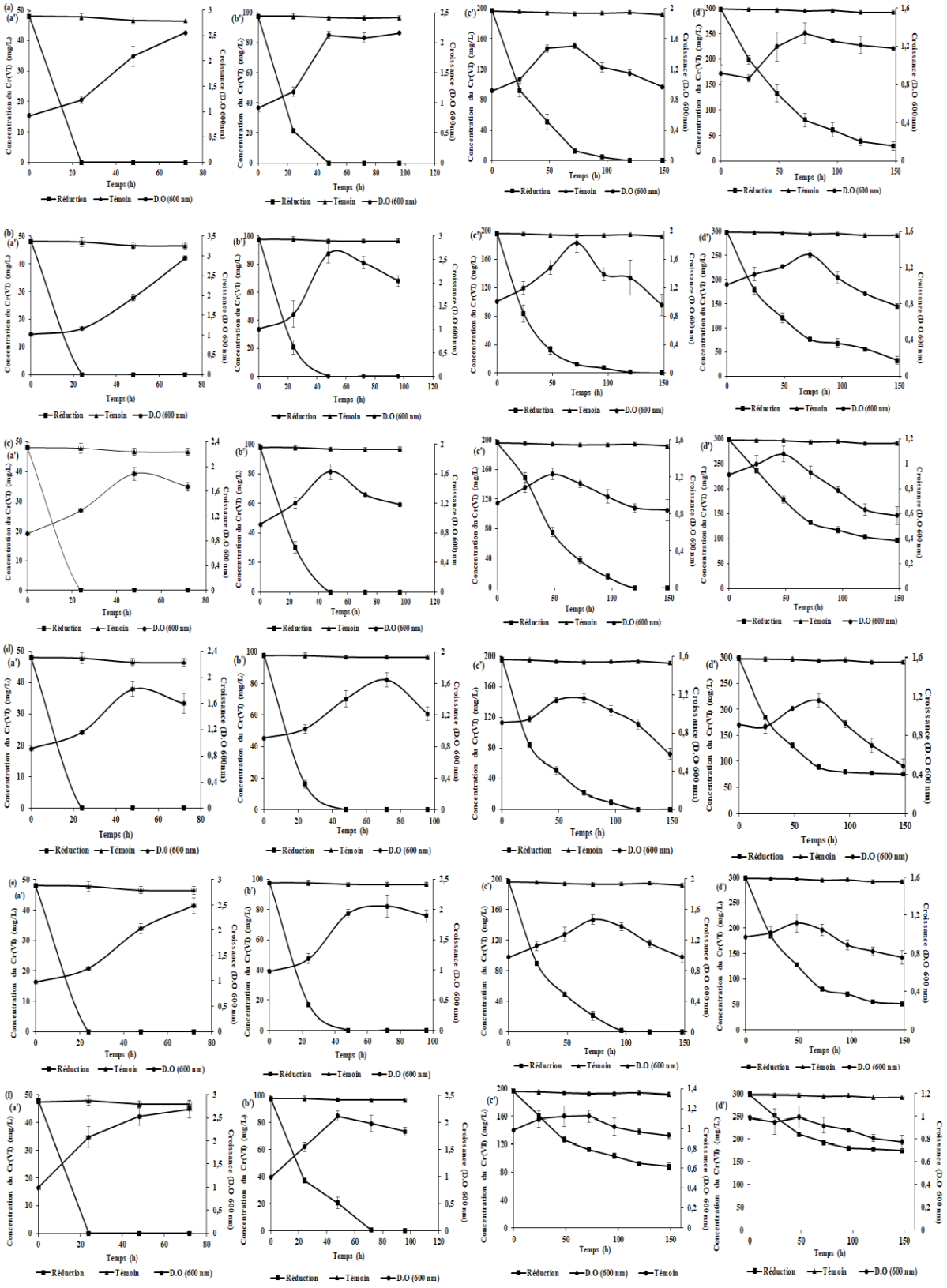


Figure 17 : Effet de différentes concentrations initiales du Cr(VI) (**a'**) 50 mg/L, (**b'**) 100 mg/L, (**c'**) 200 mg/L et (**d'**) 300 mg/L) sur la réduction du Cr(VI) et la croissance de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu LB aux conditions optimales de pH et de températures.

En général, le taux de réduction élevé du Cr(VI) enregistré pour les six souches bactériennes peut être dû au grand pouvoir d'activation des systèmes de réduction du Cr(VI) et de défense antioxydants. Ces derniers diminuent les dommages oxydatifs causés par un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sous stress du chrome assurant ainsi une réduction continue du Cr(VI) (Su et al., 2018).

D'après les résultats obtenus, on note que l'efficacité de la réduction du Cr(VI) diminue tout en augmentant la concentration du métal. Cette diminution du taux de réduction peut s'expliquer par l'altération du matériel génétique et des voies métaboliques stressées (Brezovšek et al., 2014), où il est clair que plus on augmente la concentration, plus le temps de réduction augmente. C'est-à-dire, le temps nécessaire pour l'adaptation de la souche aux fortes toxicités. Des résultats similaires ont été enregistrés dans plusieurs études, où ils ont remarqué qu'à une concentration élevée du Cr(VI), l'efficacité de la réduction diminue. Ceci est attribué à la toxicité qui inhibe certains participants actifs responsables de la réduction du Cr(VI) (McLean et al., 2000).

En parallèle, on remarque que la croissance cellulaire des différentes souches est affectée par l'augmentation de la concentration du Cr(VI) et qu'aucune activité réductrice du Cr(VI) n'a été marquée par les témoins abiotiques. Par conséquent, les effets de diverses concentrations du Cr(VI) ont confirmé que l'activité de réduction est potentiellement induite par une réaction enzymatique, puisque l'efficacité de la réduction du chrome diminue avec la diminution de la croissance bactérienne à mesure que la concentration en Cr(VI) augmente.

Le **tableau 20** donne une comparaison des résultats de réduction du Cr(VI) par nos souches bactériennes dans des conditions optimales avec ceux des bactéries mentionnées dans la littérature. En comparant nos résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs, le taux de la réduction du Cr(VI) par les six souches étudiées est relativement plus élevé. Ceci montre les performances de ces bactéries dans la détoxification du Cr(VI) même à des concentrations élevées et en un temps plus court par rapport aux souches précédemment caractérisées. Ces résultats encouragent l'utilisation de nos souches bactériennes dans le traitement des effluents industriels pollués par le Cr(VI).

Tableau 20 : Réduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes étudiées dans des conditions optimales par rapport aux autres bactéries réductrices du Cr(VI).

Souches	Concentration du Cr(VI) (mg/L)	Taux de réduction (%)	Temps (h)	pH	Température (°C)	Référence
B. paraconglomeratum	200	100	120	8	30	**Cette étude**
S. aureus	200	100	148	7 - 8	35	
B. safensis	200	100	120	7	30 - 35	
B. pumilus	200	100	120	7 - 9	30 - 35	
S. succinus	200	100	120	7	30 - 35	
S. gallinarum	100	100	96	7 - 8	30	
B. amyloliquefaciens	100	100	144	7	35	Das et al. (2014)
Stenotrophomonas maltophilia	100	98	120	7	37	Baldiris et al. (2018)
B. sp. CRB-7	100	100	48	7	37	Wu et al. (2019)
B. sp. CRB-1	50	100	24	7 - 9	36 et 42	Zhu et al. (2019)
Staphylococcus capitis	100	49.19	96	7	35	Suresh et al. (2021)
Sporosarcina saromensis W5	200	63.25	36	9 - 11	35	Huang et al. (2021a)

2.4. Effet de la présence d'autres métaux lourds

Les métaux lourds sont largement présents dans les effluents industriels et leur présence conditionne la détoxification du Cr(VI) par les microorganismes. Ainsi, le traitement de ces effluents par les bactéries nécessite d'étudier l'impact de la présence d'autres métaux sur l'efficacité de la bioremédiation du chrome, en tenant compte de l'effet de la double toxicité sur la viabilité cellulaire. Partant, l'effet de la présence de certains métaux (Ni, Zn, Co, Cu, Fe, Pb, Cd et Hg) sur la réduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes sélectionnées a été étudié et les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 18**.

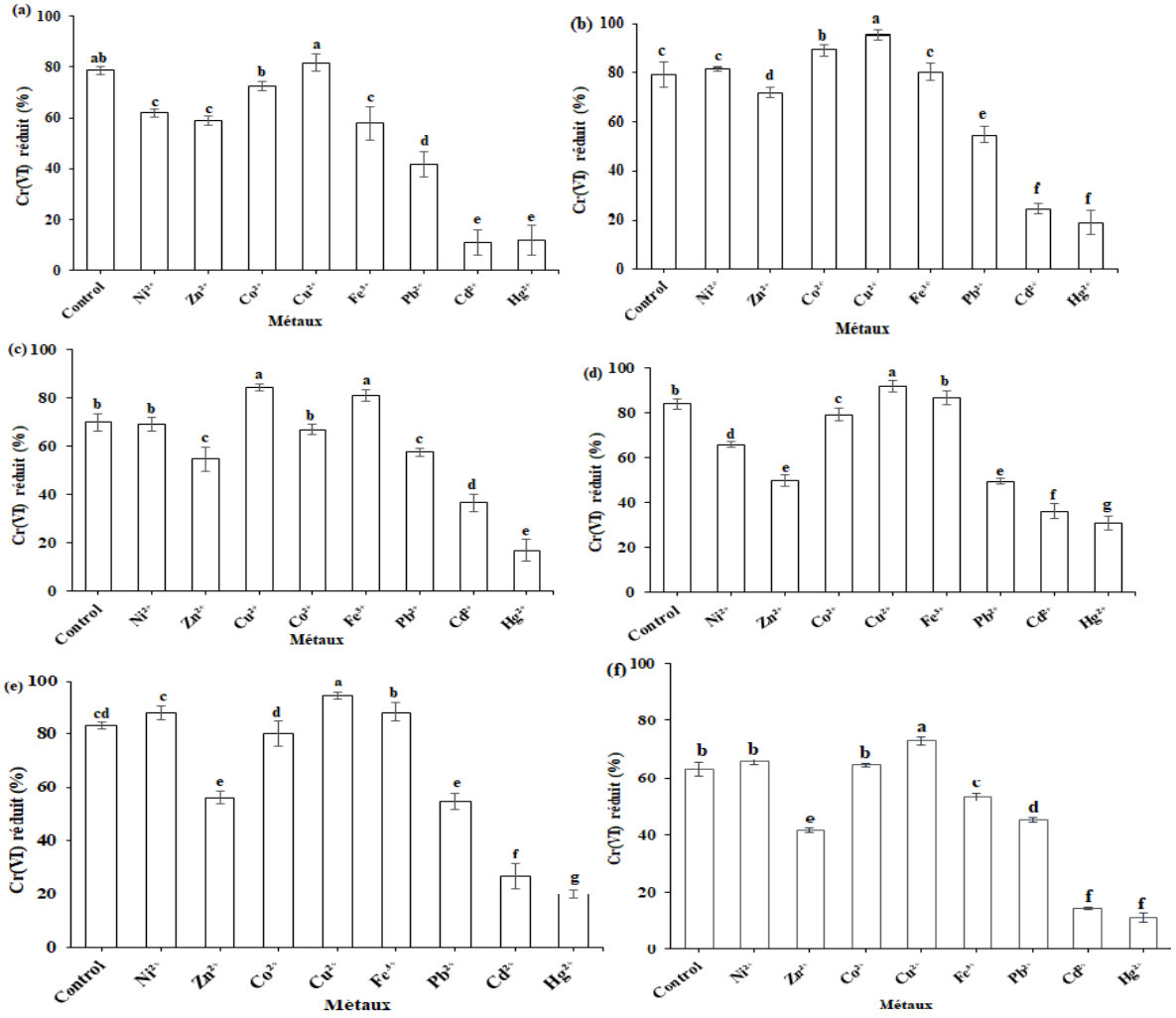


Figure 18 : Effet de la présence des métaux lourds (Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+} et Pb^{2+}) à 100 mg/L ou (Cd^{2+} et Hg^{2+}) à 10 _mg/L, sur la réduction du Cr(VI) à 100 mg/L par **(a)** *B. paraconglomeratum*, **(b)** *S. aureus*, **(c)** *B. safensis*, **(d)** *B. pumilus*, **(e)** *S. succinus* et **(f)** *S. gallinarum* dans le milieu LB, après 24 h d'incubation aux conditions optimales. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5 %, LSD-Fisher).

On observe clairement que la présence d'ions de cuivre stimule remarquablement la réduction du Cr(VI) par les six bactéries, où le taux atteint respectivement 81%, 95%, 84%, 91%, 94% et 72% pour *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2), *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus* (CRB-4), *S. succinus* (CRB-5) et *S. gallinarum* (CRB-6), respectivement. Tandis que la présence de cobalt et de fer n'affecte pas l'efficacité de la réduction. La présence d'autres métaux tels que le nickel, le zinc et le plomb affecte légèrement le processus d'élimination. Cependant, la présence du cadmium et du mercure influence significativement le taux de réduction. Ces résultats peuvent s'expliquer par la forte toxicité de ces deux métaux qui provoque la destruction de la structure protéique et l'inhibition de l'activité microbienne (Cheng et al., 2010). Le cuivre augmente considérablement l'efficacité de réduction du Cr(VI), ce métal est l'un des composants importants de certaines enzymes antioxydants telles que la catalase et la superoxyde dismutase (Sarangi and Krishnan, 2008 ; Tanrikulu et al., 2011). C'est aussi un élément indispensable pour le transport des électrons dans le système respiratoire oxydatif (Xu et al., 2015). Par conséquent, le Cu^{2+} pourrait améliorer la résistance bactérienne au Cr(VI) et l'efficacité du transfert d'électrons, améliorant ainsi la bioréduction du Cr(VI) (Tanrikulu et al., 2011 ; Xu et al., 2015). Tan et al. (2020) ont également découvert que la réduction du Cr(VI) par *Bacillus* sp. CRB-B1 est stimulé par le Cu tandis que le Cd a un effet inhibiteur. Ils ont également expliqué ces résultats par la fonction des ions de cuivre qui est une navette pour les électrons entre les sous-unités protéiques ou dans la protection du transport des électrons. De plus, les bactéries peuvent utiliser le couple redox Fe^{3+}/Fe^{2+} pour stimuler la détoxification du Cr(VI), dont certaines bactéries réductrices de fer sont également réductrices du Cr(VI) (Cummings et al., 2007 ; Huang et al., 2021b), l'exemple de *Sporosarcina saromensis* W5 (Huang et al., 2021a).

2.5. Effet des accepteurs d'électrons

Les oxyanions tels que le nitrate, le sulfate, le calcium et le carbonate existent largement dans les eaux souterraines en tant qu'accepteurs d'électrons concurrents qui pourraient influencer négativement la bioréduction du Cr(VI) en raison de l'effet compétitif. Comme le montre la **figure 19**, la présence de certains de ces anions avec une concentration de 10 mM n'influence guère la réduction du Cr(VI), indiquant que le chrome était un accepteur d'électrons supérieur. Le sulfate est l'anion le plus important car le Cr(VI) existe principalement sous la forme de CrO_4^{2-} qui est structurellement similaire au sulfate (SO_4^{2-}). Ainsi, le Cr(VI) peut facilement pénétrer dans les cellules bactériennes par les canaux de transport des sulfates membranaires (la sulfate perméase) (Mabbett and Macaskie 2001, 2001 ; Karthik et al., 2017).

La présence d'anions sulfate, nitrate, calcium et carbonate n'affecte pas la réduction du Cr(VI) par les souches *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2) et *S. succinus* (CRB-5). Ainsi, le maintien de la réduction en présence de sulfates peut s'expliquer soit par la réduction extracellulaire et/ou membranaire du Cr(VI), soit par la concentration insuffisante de sulfate pour entrer en compétition avec le Cr(VI) ou bien par l'existence d'autres systèmes de transport du Cr(VI) autres que la sulfate perméase (Joutey et al., 2016).

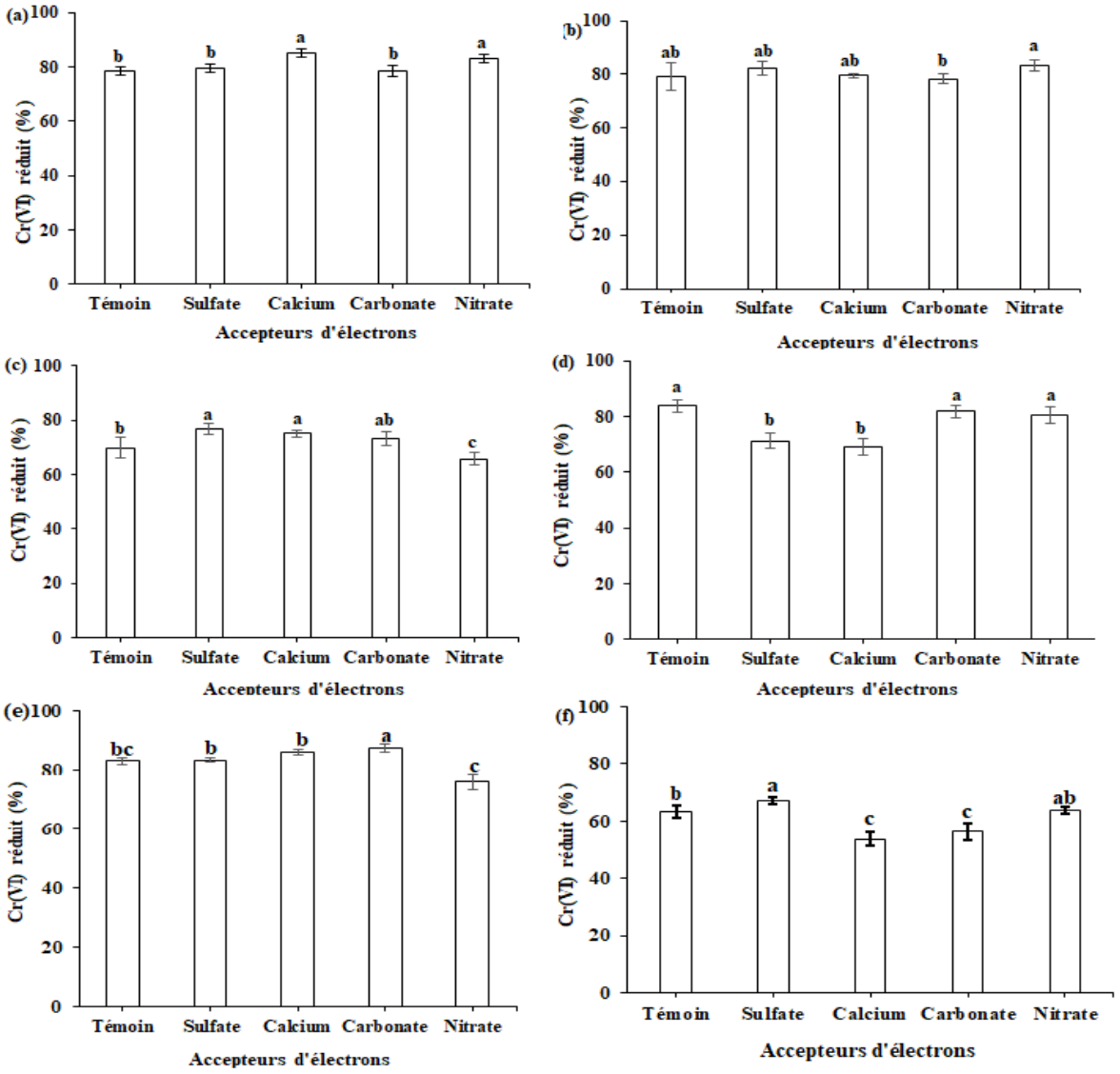


Figure 19 : Effet des accepteurs d'électrons (10 mM) sur la réduction de 100 mg/L de Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu LB après 24 h d'incubation aux conditions optimales. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5 %, LSD-Fisher).

La bioréduction du Cr(VI) par *B. safensis* (CRB-3) a été légèrement inhibée en présence de nitrates. He et al. (2015) ont également signalé que la bioréduction du Cr(VI) par la souche *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 est partiellement affectée en présence des nitrates, car il pourrait agir comme un autre accepteur d'électrons concurrent. Il en va de même pour Ma et al. (2019), où ils ont remarqué que la réduction est affectée négativement en présence des nitrates, cependant elle est normale en présence des sulfates et des carbonates. Pour, *B. pumilus* (CRB-4) et *S. gallinarum* (CRB-6), une légère inhibition du taux de réduction est notée en présence de sulfate, de carbonate et de calcium. L'effet compétitif de ces anions est aussi retrouvé chez *Serratia proteamaculans* étudiée par Joutey et al. (2014), où la réduction du Cr(VI) était affectée par le carbonate, le sulfate, le nitrate, le fer et le calcium.

2.6. Effet des donneurs d'électrons

Il existe des chaînes de transport d'électrons dans les cellules microbiennes, qui sont composées d'une série de groupes prosthétiques et de complexes enzymatiques. Les électrons des coenzymes peuvent être transportés vers des accepteurs d'électrons, tels que l'O_2, le NO_3^- et le Cr(VI), ce qui pourrait augmenter de manière significative l'efficacité de réduction des accepteurs. Dans cette étude, une variété de donneurs d'électrons (glucose, glycérol, citrate, acétate et acide benzoïque) a été ajoutée dans le milieu minimal M9 pour évaluer leurs effets sur la réduction du Cr(VI) par *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2), *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus* (CRB-4), *S. succinus* (CRB-5) et *S. gallinarum* (CRB-6) (**Figure 20**).

Les résultats obtenus montrent que certains donneurs d'électrons ont significativement favorisé la réduction du Cr(VI) par les six bactéries, dont le glucose et le glycérol sont les favoris, suivis du citrate, de l'acétate et enfin du benzoate. Pour CRB-1 (55%), CRB-2 (65%) et CRB-6 (34%) le glucose est la source de carbone préférée, pour CRB-3 (52%) et CRB-4 (59%) c'est le glycérol, alors que CRB-5 utilise ces deux sources (74% et 71% pour le glucose et le glycérol, respectivement) pour réduire efficacement le Cr(VI). Ces résultats ont en outre confirmé que la voie d'élimination du Cr(VI) par les six souches bactériennes impliquait une réduction microbienne.

Le processus de réduction du chrome par les bactéries impliquait le transport d'électrons d'un potentiel redox plus faible en tant que donneurs d'électrons (comme les sources de carbone) vers des substances à potentiel redox plus élevé (Cr(VI)) (Gonzalez et al., 2014). Par conséquent, les taux de réduction du Cr(VI) ont été accélérés en ajoutant des donneurs

d'électrons. Cependant, les souches bactériennes ont probablement des structures et des voies métaboliques différentes. Ainsi, seule une fraction des sources de carbone pourrait être utilisée par une souche bactérienne spécifique. Dey et al. (2016) et Zeng et al. (2019) ont constaté que le glycérol était la meilleure source de carbone pour la réduction du Cr(VI) par *Corynebacterium paurometabolum* et *Oceanobacillus oncorhynchi* W4, respectivement. Alors que la réduction du Cr(VI) pourrait être significativement favorisée pour *Bacillus sphaericus* (Pal et al., 2005), *Serratia* sp. (Gonzalez et al., 2014) et *Pseudomonas Aeruginosa* (Kang et al., 2015) en présence de glucose, résultat expliqué par la facilité d'oxydation du glucose par les souches bactériennes (Murugavelh and Mohanty, 2013). Les donneurs d'électrons pourraient améliorer la bioréduction du Cr(VI) par les bactéries. Par conséquent, la sélection d'une source de carbone supplémentaire peu coûteuse et efficace (comme le glucose industriel) pour promouvoir la bioréduction du Cr(VI) pour les processus de traitement microbiologique de la pollution au Cr(VI) est important.

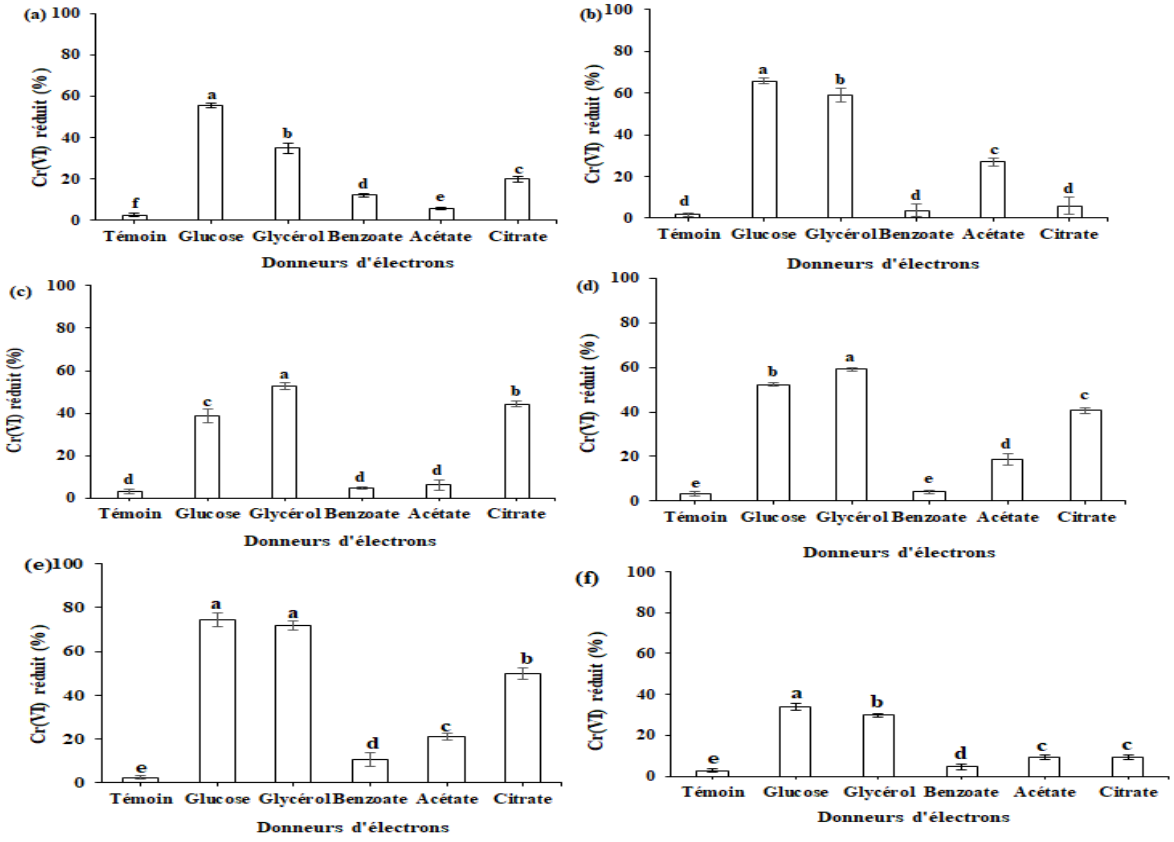


Figure 20 : Effet des donneurs d'électrons (10 mM) sur la réduction de 100 mg/L de Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu minimal M9 après 7 jours d'incubation aux conditions optimales. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

2.7. Effet de la dénaturation des protéines et de la viabilité cellulaire

Afin de vérifier si la réduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes étudiées était un processus à médiation enzymatique, une dénaturation des protéines cellulaires par des agents chimiques, tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS) et le nitrate d'argent (Ag^+) et par traitement thermique a été appliquée. Comme le montre la **figure 21**, tous ces traitements pourraient significativement affecter ou même arrêter la réduction effective du Cr(VI) par les souches bactériennes. Ainsi, une diminution de l'efficacité de réduction après traitement thermique par 59%, 58%, 46%, 59%, 65% et 44%, de 56%, 69%, 49%, 59%, 65% et 44% après dénaturation par le SDS et de 54%, 60%, 51%, 58%, 70% et 53% après traitement par l'Ag^+, respectivement pour CRB-1, CRB-2, CRB-3, CRB-4, CRB-5 et CRB-6.

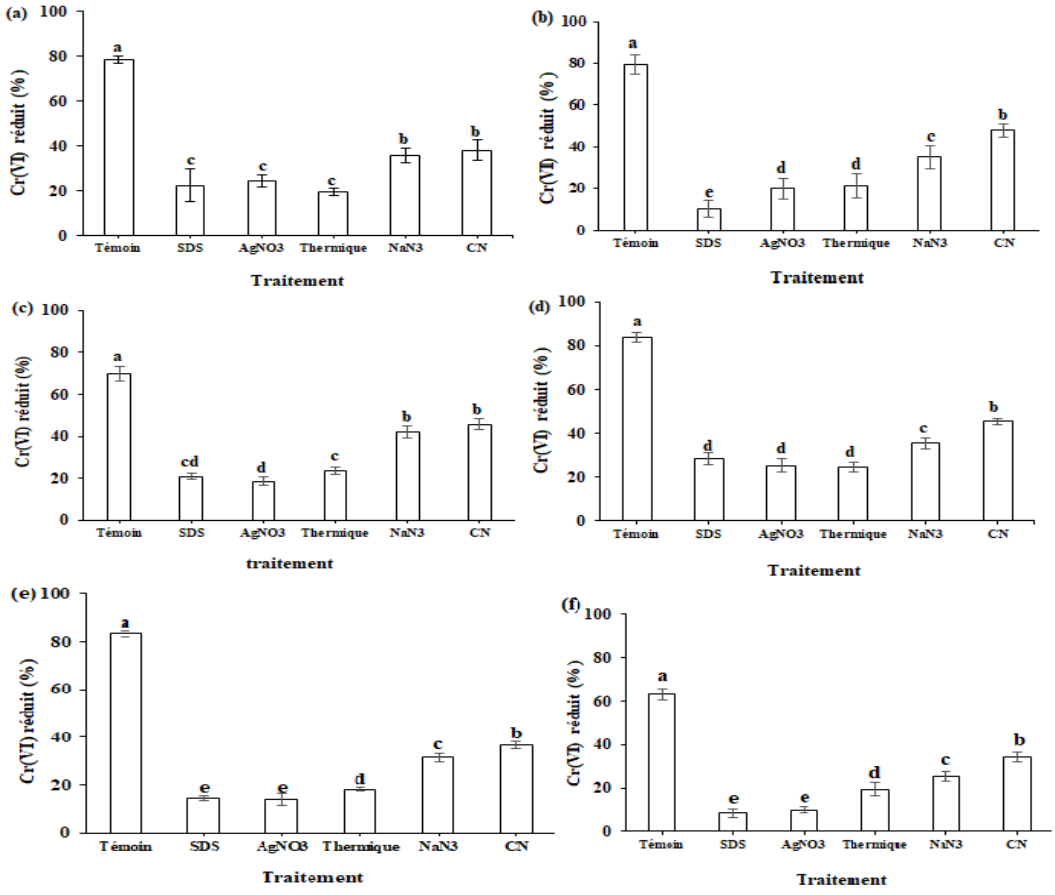


Figure 21 : Effet de la dénaturation protéiques et des inhibiteurs du métabolisme sur la réduction de 100 mg/L de Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* après 24 h d'incubation dans des conditions optimales de pH et de température. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

Ces résultats obtenus concordent avec les travaux d'autres chercheurs qui confirment que ces dénaturants ont la capacité de déformer et/ou de détruire les protéines bactériennes (Cheng et al., 2010 ; Anand et al., 2015 ; Tan et al., 2020).

La réduction d'une concentration assez importante du Cr(VI) par les cellules tuées par la chaleur indique que l'adsorption du Cr(VI) à la surface de la membrane cellulaire est également impliquée. Ces résultats affirment que la réduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes était principalement un processus enzymatique précédé par son adsorption. Des résultats similaires ont été rapportés par Joutey et al. (2016) qui indiquent que la réduction du Cr(VI) par la souche *Leucobacter chromiireducens* est précédée par l'adsorption du Cr(VI) sur la surface cellulaire. De plus, l'inhibition remarquable de la réduction du Cr(VI) par les souches bactériennes lors du traitement par le SDS et l'Ag^{+} confirme le rôle majeur des protéines dans le processus d'élimination du Cr(VI). Cela a été bien montré pour plusieurs autres bactéries étudiées précédemment (Ma et al. 2019).

L'intervention du métabolisme cellulaire a également été évaluée par les deux inhibiteurs ; NaN_3 et CN qui bloquent le flux d'électrons à travers le système de transport membranaire (Chirwa, 2005). Les résultats obtenus montrent clairement que la présence de ces inhibiteurs perturbe la réduction bactérienne du Cr(VI). Le taux de réduction a diminué de 43%, 44%, 28%, 48%, 52% et 38% pour l'azide et de 40%, 32%, 24%, 38%, 47% et 29 % pour le cyanure, respectivement pour CRB-1, CRB-2, CRB-3, CRB-4, CRB-5 et CRB-6. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ces inhibiteurs empêchent la synthèse de nouvelles enzymes réductases mais n'inhibent pas l'activité de celles déjà présentes (Garbisu et al., 1998). Des résultats comparables ont été rapportés par Biswas et al. (2018) lors de la réduction du Cr(VI) par les cellules de *Halomonas smyrnensis* KS802 traitées au cyanure et celles de *Serratia proteamaculans* étudiées par Joutey et al. (2014) et traitées avec de l'azide, où le taux de réduction a été remarquablement affecté.

3. Etude de la réduction du Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées

Le traitement des effluents industriels pollués par les métaux lourds en utilisant des microorganismes et notamment les bactéries, présente plusieurs avantages économiques et environnementaux. L'introduction de la technique d'immobilisation des cellules bactériennes dans des matrices telles que l'alginate a attiré davantage l'attention en raison de son efficacité remarquable en termes de protection cellulaire, de réutilisation des biobilles et de limitation

des variations des paramètres environnementaux (Ramkrishan and Sivasubramanian, 2013). Par conséquent, nous avons cherché à mettre en évidence les performances des cellules libres par rapport à celles des cellules immobilisées dans des billes d'alginate et à montrer l'effet des contaminations répétées et celui du milieu (modifié et non modifié) sur la réduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes libres et immobilisées.

3.1. Réduction du Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées

Les résultats présentés dans la **figure 22** montrent que l'efficacité de réduction du Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées de *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2) et *B. safensis* (CRB-3) est la même, puisque 100 mg/L de Cr(VI) a été complètement réduite après 48 h d'incubation. Des résultats analogues ont été obtenus par Yang et al. (2009), où les cellules immobilisées et libres d'*Intrasporangium* sp. Q5-1 ont présenté un taux de réduction similaire.

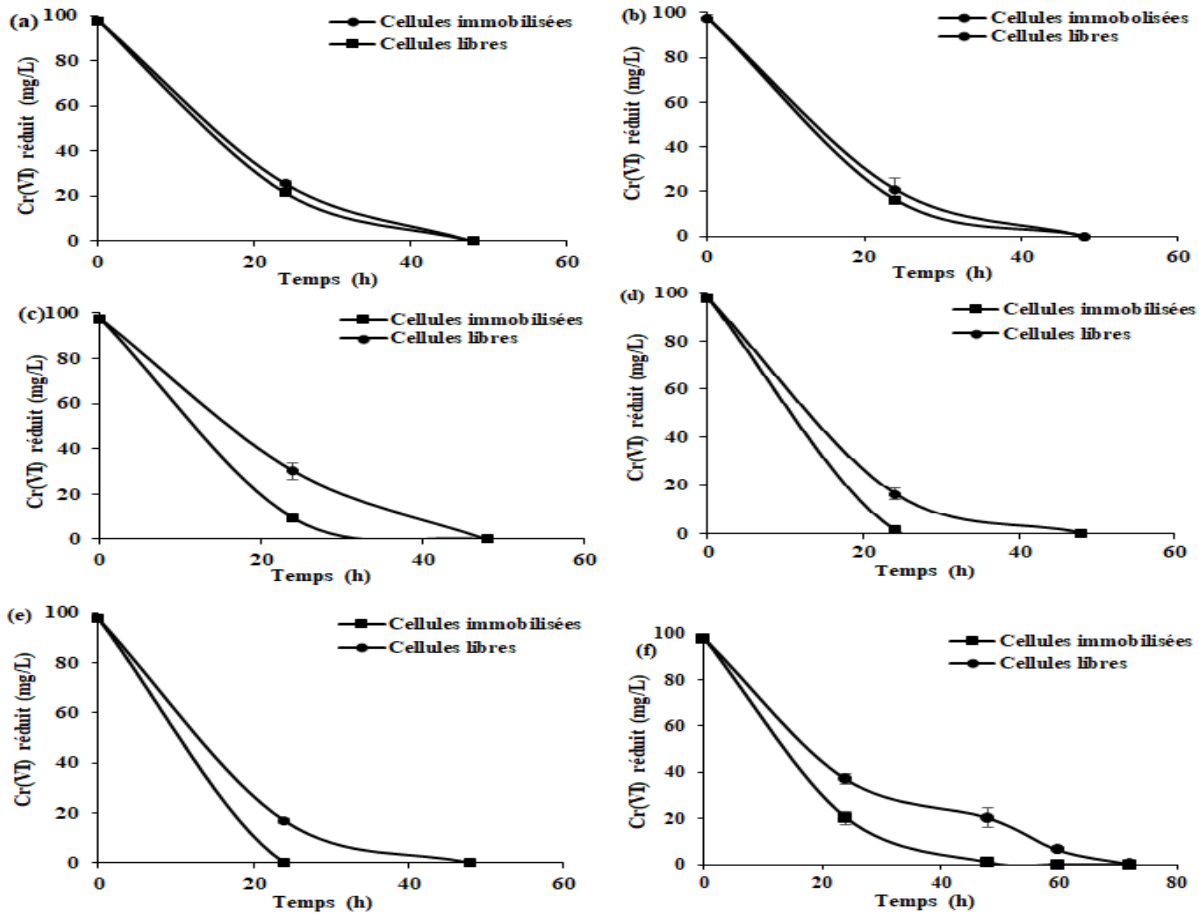


Figure 22 : Réduction de 100 mg/L de Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* dans le milieu LB dans des conditions optimales de pH et de température. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

Les cellules de *B. pumilus* (CRB-4), *S. succinus* (CRB-5) et *S. gallinarum* (CRB-6) à l'état immobilisées ont montré une efficacité de réduction significative en comparaison à l'état libre. Une réduction totale a été obtenue après 24 h d'incubation par les cellules immobilisées de CRB-4 et CRB-5 et après 60 h par celles de CRB-6. Alors que pour les cellules libres de CRB-4 et CRB-5, la réduction complète est observée après 48 h et pour CRB-6 après 72 h. Yadav et al. (2021) ont rapporté que les cellules immobilisées d'*Ochrobactrum intermedium* dans des billes d'alcool polyvinylique et d'alginate de sodium ont montré une efficacité remarquable dans le traitement des effluents de tanneries par rapport aux cellules libres. Des résultats similaires ont été enregistrés par Sultan and Hasnain (2007), Poopal and Laxman (2008), Joutey et al. (2016) et Kumari et al. (2016) pour les cellules immobilisées de *Ochrobactrum intermedium* SDCr-5, *Streptomyces griseus*, *Leucobacter chromiireducens* CRB-2 et *Bacillus cereus* en comparaison avec les cellules libres. Cette efficacité des cellules immobilisées est attribuée à la protection conférée par les billes contre la toxicité du chromate à des niveaux élevés (Konovalova et al., 2003).

3.2. Réduction répétée par les cellules libres et immobilisées dans un milieu modifié et non modifié

La performance des cellules libres et immobilisées des six souches bactériennes à réduire les contaminations répétées de 100 mg/L du Cr(VI) pendant 6 cycles continus en LB renouvelé et non renouvelé a été étudiée et les résultats sont illustrés dans la **figure 23**. Les résultats montrent clairement que dans le LB non renouvelé, les cellules immobilisées des six souches bactériennes ont pu réduire efficacement les contaminations répétées de 100 mg/L du Cr(VI) après 3 cycles pour *S. gallinarum* (CRB-6), 4 cycles pour *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus* (CRB-4) et *S. succinus* (CRB-5), alors que pour *S. aureus* l'efficacité a été maintenue jusqu'à 5 cycles. Cependant, les cellules libres de CRB-1, CRB-2, CRB-4 et CRB-5 ont conservé leur efficacité de réduction pendant les 2 premiers cycles et pour CRB-3 pendant un seul cycle. Dans le milieu LB renouvelé, l'efficacité des cellules immobilisées diminue légèrement, alors que généralement les cellules libres des six souches bactériennes ont conservé leur pouvoir réducteur après lavage et réintroduction dans le milieu LB fraîchement préparé.

La diminution de l'efficacité d'élimination du Cr(VI) par les cellules libres en LB non renouvelé et celles des cellules immobilisées en LB renouvelé s'explique par la perte d'enzymes réductases sous l'effet des concentrations accumulées de Cr(VI), de l'incubation, de

l'agitation, de la mutation et de la détérioration pouvant survenir au fil des lavages successifs (Farag and Zaki, 2010). Résultats également notés par les cellules immobilisées de *Pseudomonas aeruginosa* étudiées par Pang et al. (2011), où l'efficacité de la réduction diminue significativement après 7 cycles. Ainsi, certaines cellules immobilisées présentent des avantages par rapport aux cellules libres pour détoxifier le Cr(VI) en milieu non renouvelé et sans apport de nutriments, en ce sens qu'elles sont plus stables, facilement réutilisables et avec un colmatage minimal dans les systèmes continus, ce qui les rend plus économiques (Yang et al., 2009).

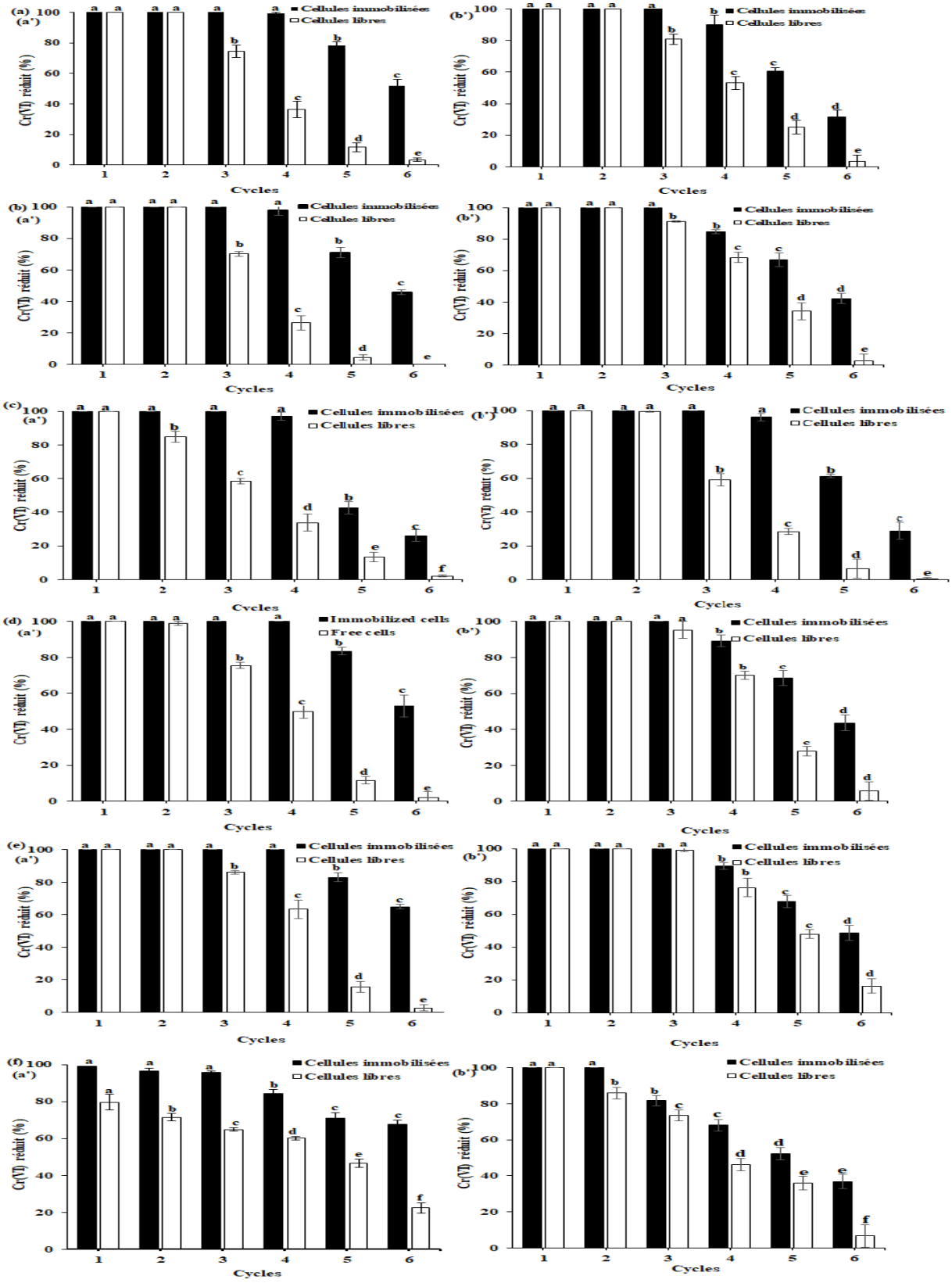


Figure 23 : Réduction répétée de 100 mg/L de Cr(VI) par les cellules libres et immobilisées de (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum* en milieu LB (**a'**) non modifié et (**b'**) modifié dans des conditions optimales de pH et de température. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

IV. Etude des mécanismes d'élimination du Cr(VI) par les souches bactériennes

L'élimination du Cr(VI) par les microorganismes fait intervenir différents mécanismes qui sont principalement : absorption impliquant différentes formes d'adsorption (Brown et al., 2006 ; Saha and Orvig, 2010), réduction extracellulaire du Cr(VI) en Cr(III), réduction membranaire généralement précédée de l'adsorption du Cr(VI) sur les groupements fonctionnels présent à la surface des cellules et réduction intracellulaire suivie d'une libération de Cr(III) à l'extérieur des cellules. Ce dernier type de réduction maintient la concentration cytoplasmique de Cr(VI) à un niveau bas et facilite l'accumulation de chromate dans la cellule (Opperman and van Heerden, 2008a ; Ngwenya and Chirwa, 2011).

Dans le but de définir les mécanismes de détoxification du Cr(VI) utilisés par les six souches bactériennes sélectionnées (*B. paraconglomeratum*, *S. aureus*, *B. safensis*, *B. pumilus*, *S. succinus* et *S. gallinarum*), une étude approfondie de l'adsorption du Cr(VI) à la surface cellulaire par modélisation des isothermes d'adsorption et analyse par MEB-EDX et IRTF des cellules bactériennes, ainsi que des expériences pour déterminer la localisation, l'expression et les poids de chromate réductase ont été réalisées.

1. Etude de l'adsorption du Cr(VI) sur la surface cellulaire

Pour évaluer la capacité de biosorption d'une biomasse solide et son affinité de surface vis-à-vis du sorbate en milieu liquide, deux modèles d'isothermes tels que Langmuir et Freundlich sont largement utilisés (Bueno et al., 2008 ; Ren et al., 2015). Dans notre étude, les modèles isothermes de Langmuir et Freundlich ont été utilisés pour analyser le mécanisme du processus d'adsorption du Cr(VI) par les six souches bactériennes étudiées.

1.1. Modélisation des isothermes d'adsorption

Le modèle de Langmuir prédit que l'adsorption est basée sur l'attachement d'une monocouche avec des forces homogènes et qu'il y a une énergie égale pour tous les sites et une fois que ces sites sont complètement saturés, aucune autre adsorption ne peut avoir lieu (Behera et al., 2017 ; Daneshvar et al., 2019). Alors que le modèle de Freundlich a été développé pour le processus d'adsorption hétérogène, expliquant la liaison du métal à la surface multicouche du sorbant ou à des sites de support de surface d'affinités différentes (Bulgariu et al., 2013 ; Batool et al., 2018).

Le modèle d'isotherme de Langmuir pour l'adsorption du Cr(VI) a été tracé sous la forme $\mathbf{C_e/q_e}$ en fonction de $\mathbf{C_e}$ (**Figure 24**).

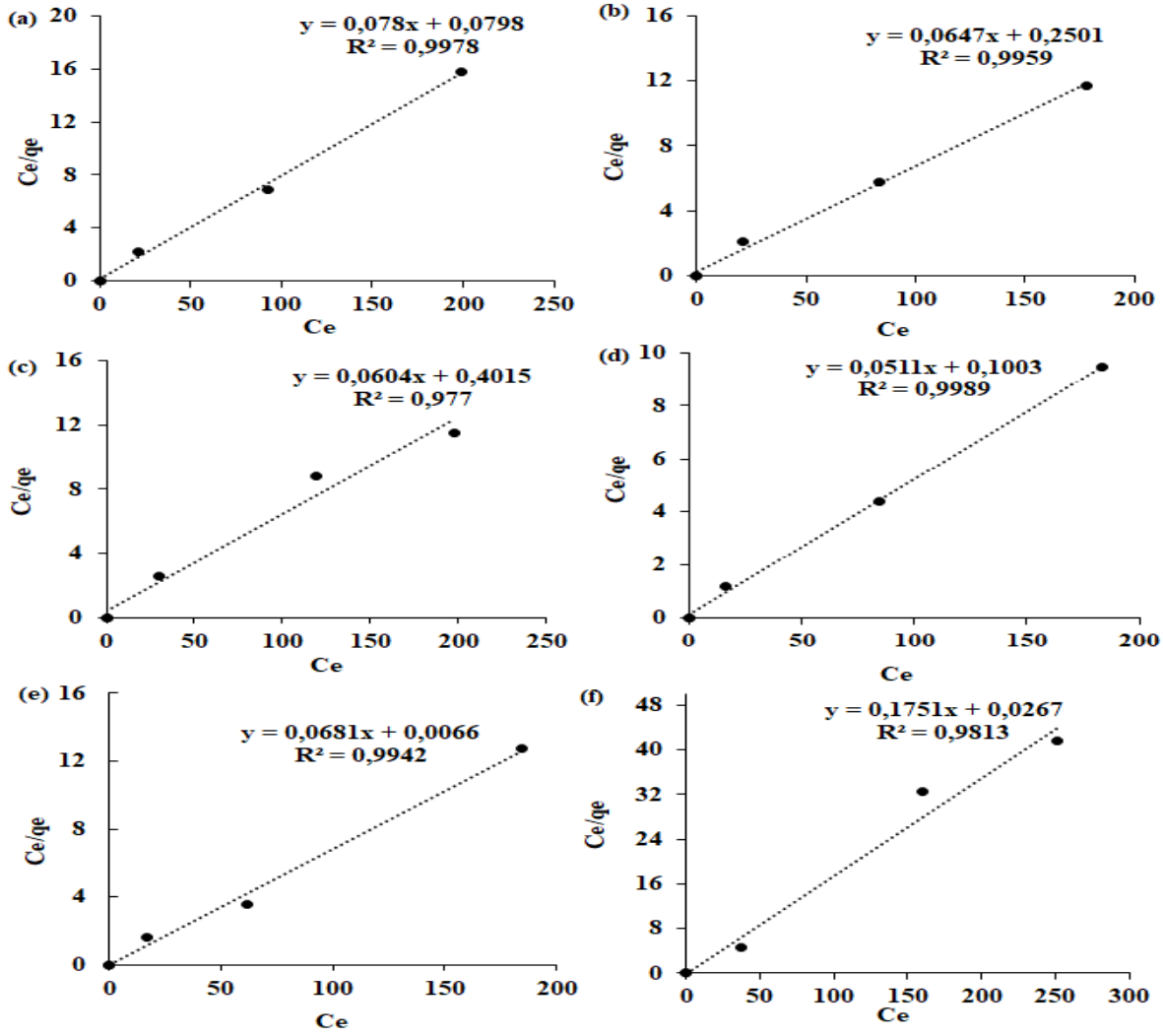


Figure 24 : Modèle isotherme de Langmuir lors de la biosorption du Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum*.

Dans cette étude, les valeurs de q_m, K_L, R^2 et R_L pour l'isotherme de Langmuir ont été calculées à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite du tracé et présentées dans le **tableau 21**. Les valeurs du paramètre d'équilibre (R_L) obtenues lors de la biosorption du Cr(VI) par les six souches bactériennes sont de l'ordre de 0,003, 0,012, 0,021, 0,006, 0,001 et 0,005 pour *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2), *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus* (CRB-4), *S. succinus* (CRB-5) et *S. gallinarum* (CRB-6), respectivement, confirmant l'adsorption favorable de l'ion chrome sur les surfaces des cellules bactériennes. Alors que, l'isotherme de Freundlich a été tracée en prenant log q_e en fonction de log C_e (**Figure 25**) et

les valeurs du coefficient de corrélation (R^2), de k_f et de 1/n obtenues à partir de la pente et de l'intersection de la ligne droite du tracé sont également regroupés dans le **tableau 21**.

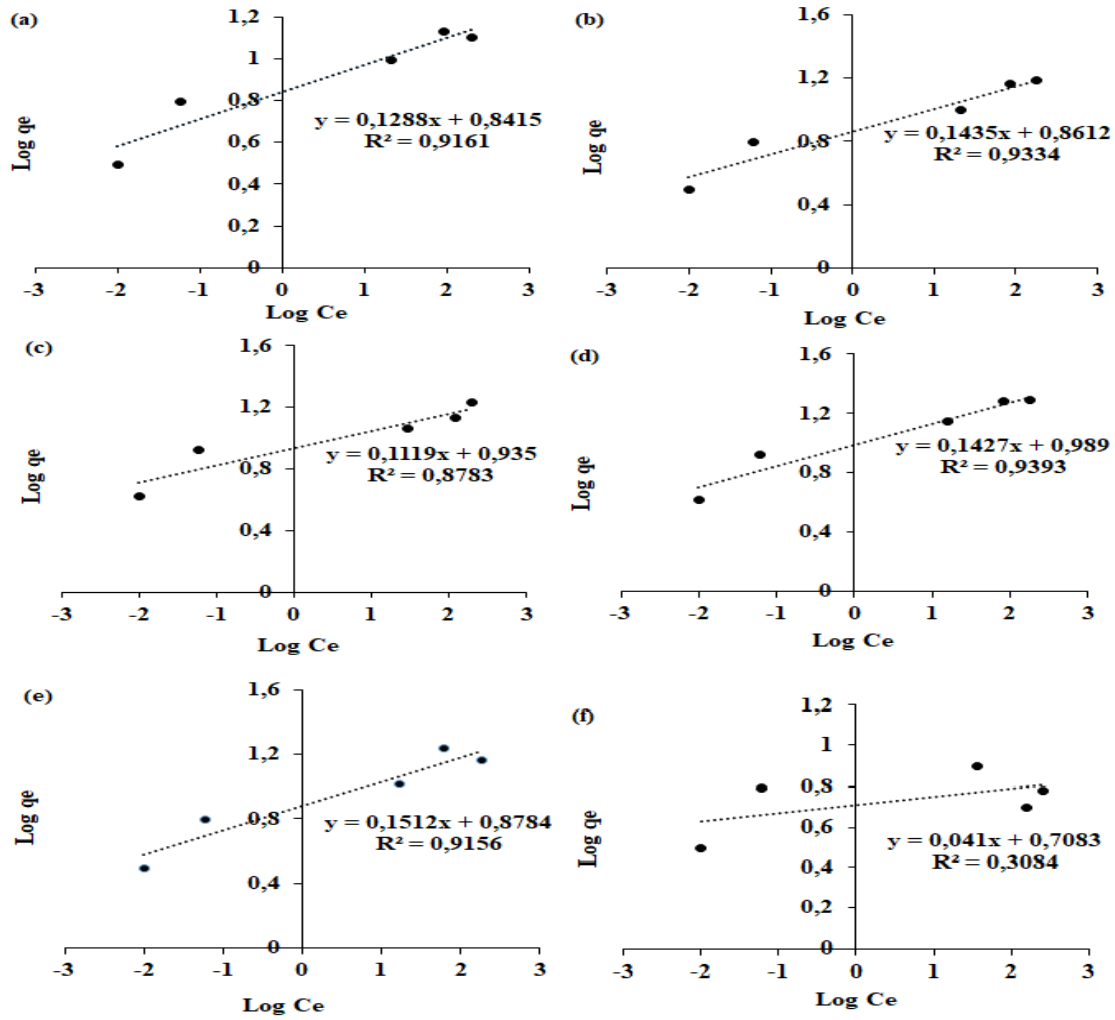


Figure 25 : Modèle isotherme de Freundlich lors de la biosorption du Cr(VI) par (**a**) *B. paraconglomeratum*, (**b**) *S. aureus*, (**c**) *B. safensis*, (**d**) *B. pumilus*, (**e**) *S. succinus* et (**f**) *S. gallinarum*.

D'après les valeurs R^2 des deux modèles, il était évident que l'adsorption du Cr(VI) par les six souches étudiées était mieux adaptée au modèle de Langmuir qu'au modèle de Freundlich. Ces résultats indiquent que l'adsorption des ions chrome sur les présentes biomasses bactériennes a suivi le mécanisme de biosorption monocouche et homogène sur des sites actifs d'affinités similaires (Tunali et al., 2006 ; Prasad et al., 2013). Plusieurs études dans lesquelles la biomasse bactérienne favorise le modèle isotherme de Langmuir pour l'adsorption du Cr(VI) ont été rapportées, l'exemple de : *Aeromonas caviae* (Loukidou et al., 2004), *Paenibacillus xylanilyticus* MR12 (Rawat et al., 2013), *Arthrobacter viscosus* (Hlihor et al., 2017) et *Halomonas* sp. DK4 (Kalola and Desai, 2020).

Tableau 21 : Paramètres des isothermes d'adsorption du Cr(VI) par les six souches bactériennes.

Isotherme	Paramètres	CRB-1	CRB-2	CRB-3	CRB-4	CRB-5	CRB-6
Langmuir	q_m	12,82	20,921	16,556	19,569	14,684	5,711
	K_L	0,977	0,258	0,15	0,509	10,318	6,558
	R^2	0,997	0,996	0,977	0,999	0,994	0,981
	R_L	0,003	0,012	0,021	0,006	0,001	0,005
Freundlich	1/n	0,128	0,143	8,936	0,143	0,151	0,041
	K_f	6,942	8,044	0,119	9,749	7,887	5,108
	R^2	0,916	0,933	0,878	0,939	0,915	0,308

1.2. Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) couplé à la spectrométrie dispersive en énergie des rayons X (EDX)

Afin d'analyser visuellement la morphologie, de caractériser et de mieux comprendre le mécanisme de bioréduction du Cr(VI) par les six souches bactériennes, une microanalyse par MEB-EDX a été effectuée. L'analyse par le MEB (**Figure 26**) a révélé que des surfaces relativement pleines, sans rides, lisses et de forme régulière ont été observées pour les cellules témoins non traitées. Après traitement avec 100 mg/L du Cr(VI), les cellules sont devenues irrégulières, ridées et des débris cellulaires sont apparus dans les champs visuels, ce qui a également été signalé chez d'autres bactéries traitées au Cr(VI) (Wu et al., 2019). De plus, les cellules CRB-5 et CRB-6 traitées au chrome ont sécrété un matériau plus visqueux, qui peut être des EPS (paragraphe II.4), ainsi une partie des cellules est devenue mince, ce qui était également conforme aux études précédentes (Das et al., 2014).

En effet, le Cr(VI) est connu pour provoquer plusieurs modifications morphologiques chez les bactéries, telles qu'une surface poreuse et irrégulière avec l'apparition de rides et de cellules allongées en raison du stress induit par sa toxicité (Batool et al., 2012). De plus, les changements morphologiques des cellules traitées au Cr(VI) semblaient également être associés à l'adsorption du chrome (Kumari et al., 2016), qui pourrait jouer un rôle clé dans l'interaction du chrome sur la surface bactérienne et l'induction du mécanisme de réduction pour faire face à la toxicité du Cr(VI) (Karthik et al., 2017). Plusieurs chercheurs ont

également attribué les déformations des cellules exposées au Cr(VI) à son adsorption au niveau de la paroi bactérienne (Wu et al., 2019 ; Tan et al., 2020).

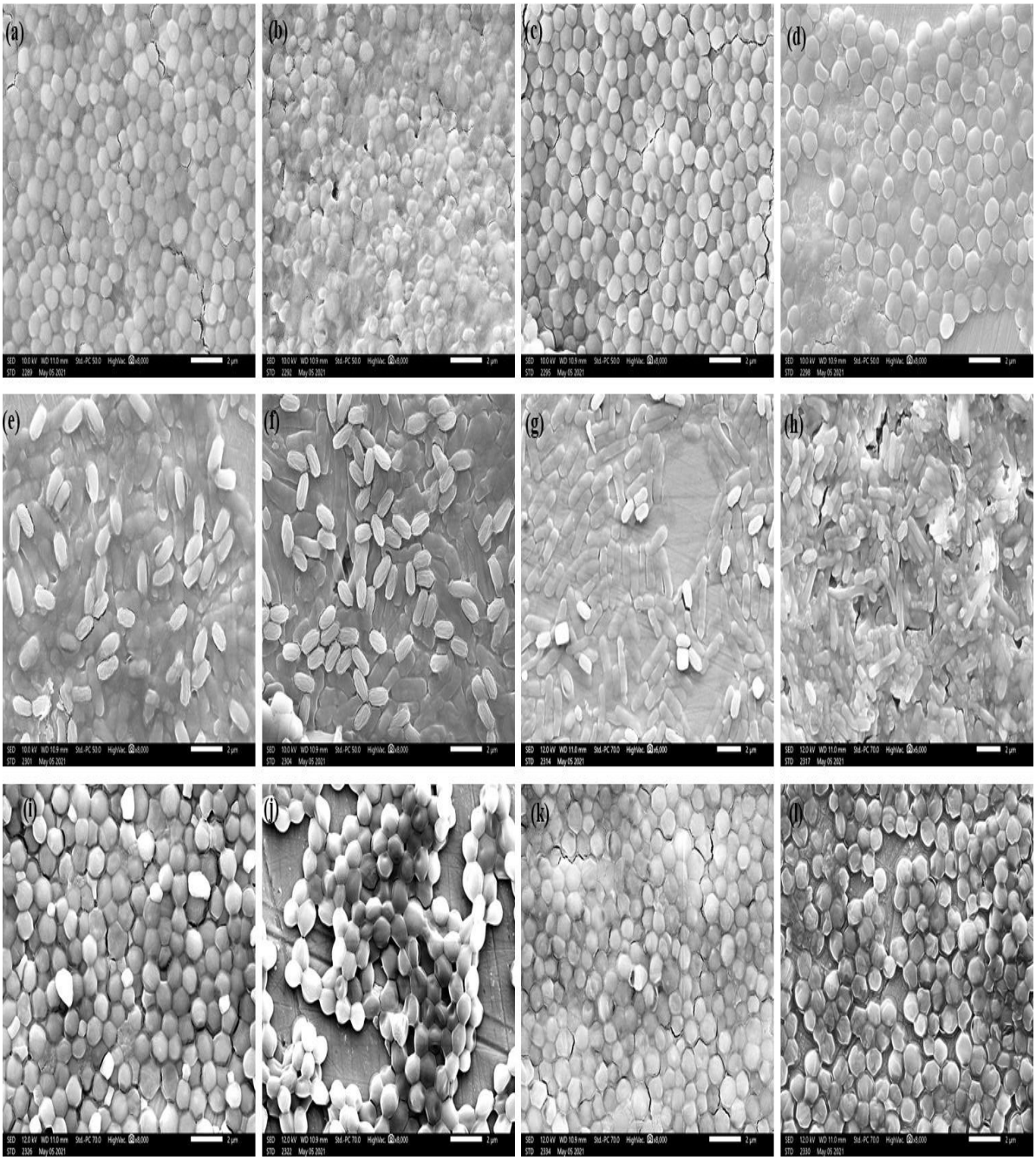


Figure 26 : Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) des cellules témoins (**a**), (**c**), (**e**), (**g**), (**i**) et (**k**) et traitées (**b**), (**d**), (**f**), (**h**), (**j**) et (**l**) par 100 mg/L du Cr(VI) respectivement, pour *B. paraconglomeratum*, *S. aureus*, *B. safensis*, *B. pumilus*, *S. succinus* et *S. gallinarum*.

La **figure 27** montre qu'en l'absence du Cr(VI), les cellules témoins n'ont pas présenté de pic de Cr spécifique lorsqu'elles ont été analysées par EDX. En revanche, dans les cellules traitées au Cr(VI), des pics caractéristiques de chrome ont été détectés, ce qui devrait être dû au Cr(VI) ou à des espèces précipitées de chrome réduit (Cr(III)) liés aux groupes fonctionnels. Par conséquent, l'existence de l'élément Cr a démontré l'adsorption ou le dépôt de produits Cr(VI) et/ou Cr(III) à la surface des cellules bactériennes (Karthik et al., 2017).

Étant donné que la plupart des composés du Cr(VI) sont hautement solubles et que la majorité des composés du Cr(III) sont relativement insolubles, il est tentant de supposer que le Cr présent à la surface des cellules est sous la forme hexavalente et/ou trivalente résultant de la bioréduction membranaire ou intracellulaire du Cr(VI) (Pei et al., 2009). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que le CrO_4^{2-} avait une structure moléculaire similaire à celle de SO_4^{2-}, comme nous l'avons expliqué précédemment, ce qui assure un transport aisé du Cr(VI) vers l'intérieur des cellules par le système de transport de sulfate, ou resté au niveau de la membrane cellulaire. Par la suite, il pourrait être réduit sur la membrane ou à l'intérieur de la cellule par différents réducteurs non spécifiques (tels que le NADH, le NADPH, l'acide ascorbique, les acides aminés et les nucléotides) (Cheung and Gu, 2007 ; Quintelas et al., 2009). Étant donné que le Cr(VI) est hautement soluble, alors que le Cr(III) affiche une forte affinité pour les composés organiques conduisant à la formation de précipitations complexes, par exemple l'hydroxyde amorphe, il est tentant de supposer que le chrome dans les cellules des six souches est sous la forme réduite (Cr(III)) résultant du processus de réduction du Cr(VI).

Par conséquent, on peut conclure que le chrome à la surface cellulaire et due principalement à l'adsorption du Cr(VI) suivie de sa réduction et de la précipitation du Cr(III), observations également rapportées par Li et al. (2008), Jin et al. (2017), Karthik et al. (2017) et Zeng et al. (2019) pour les cellules d'*Ochrobactrum anthropi*, *Acinetobacter* sp. WB-1, *Exiguobacterium indicum* MW1 et *Oceanobacillus oncorhynchi* W4 exposées au Cr(VI), respectivement. D'après les résultats de l'analyse des cellules des six souches bactériennes par MEB-EDX, les changements observés montrent le pouvoir des cellules à affronter la toxicité du Cr(VI) par excrétion de certaines substances (EPS) et élimination du Cr(VI) qui s'est effectuée principalement par bioréduction précédée d'adsorption.

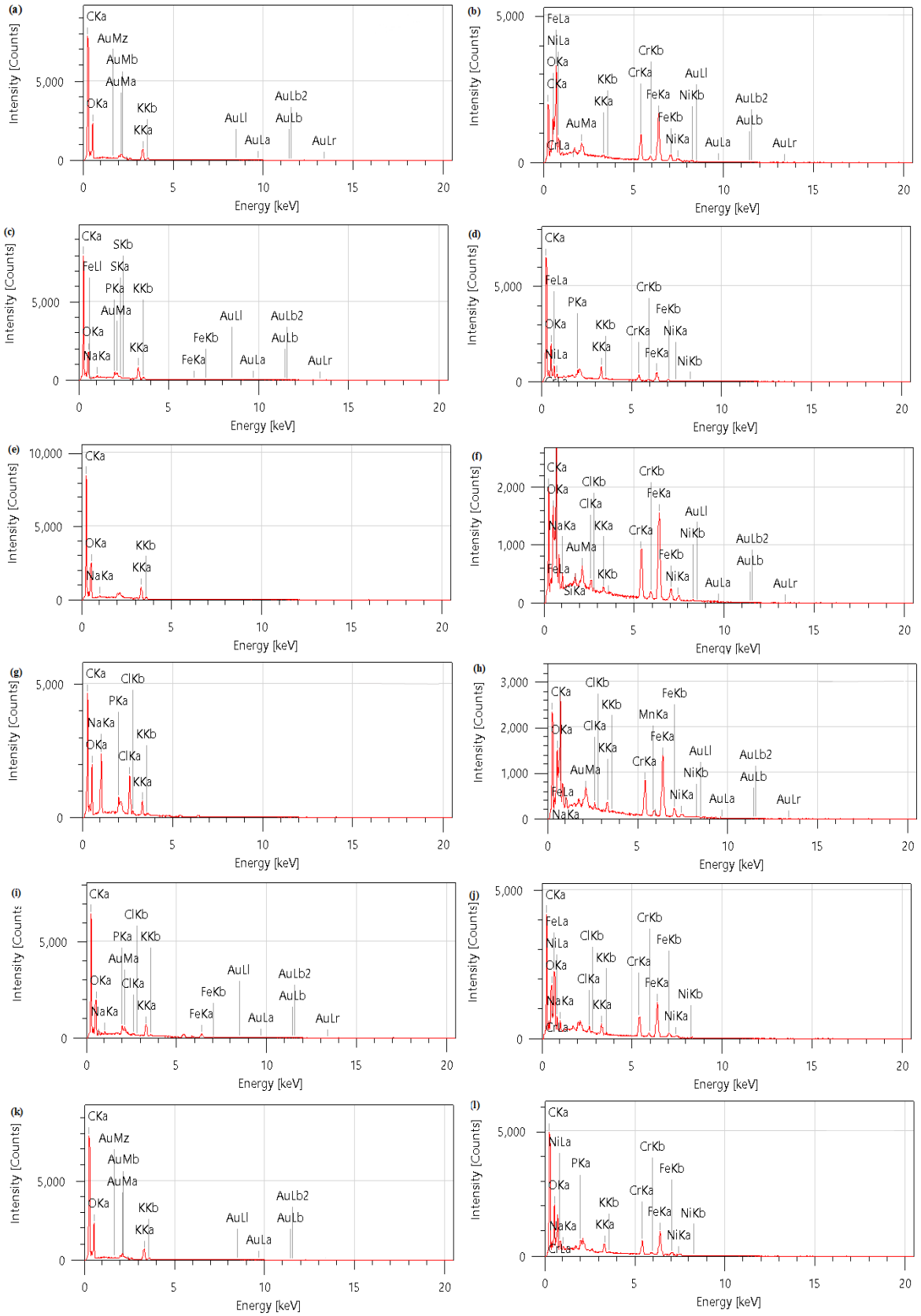


Figure 27 : Analyse de la composition élémentaire avec sonde EDX des cellules témoins (**a**), (**c**), (**e**), (**g**), (**i**) et (**k**) et traitées (**b**), (**d**), (**f**), (**h**), (**j**) et (**l**) par 100 mg/L du Cr(VI) respectivement, pour *B. paraconglomeratum*, *S. aureus*, *B. safensis*, *B. pumilus*, *S. succinus* et *S. gallinarum*

1.3. Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Une comparaison des spectres IRTF des six CRB étudiées avant et après exposition à 100 mg/L du Cr(VI) peut fournir des informations supplémentaires sur la nature de l'interaction possible des groupes fonctionnels des surfaces cellulaires bactériennes avec le chrome (**Figure 28**). Pour les cellules témoins et traitées de *S. aureus* (CRB-2) (c et d) et *S. succinus* (CRB-5) (i et j), des pics similaires de 3400 cm^{-1}, 1600 cm^{-1}, 1500 cm^{-1}, 1400 cm^{-1}, 1240 cm^{-1} et 1050 cm^{-1} ont été rapportés comme hydroxyle, amide I, amide II, alcane, carboxyle et phosphoryle, respectivement. L'analyse de ces spectres montre qu'aucune différence significative ni dans la position ni dans l'apparence des bandes n'a été observée. Des résultats similaires ont été rapportés par Das et al. (2014) qui n'ont trouvé aucune différence dans les spectres IRTF des cellules de *Bacillus amyloliquefaciens* non traitées et traitées avec 100 mg/L du Cr(VI).

Les spectres IRTF des souches *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus* (CRB-4) et *S. gallinarum* (CRB-6) montrent des différences variées de position et d'intensité des pics. Généralement, dans les différents spectres, des bandes typiques de :

- La bande située entre 3200-3600 cm^{-1} est attribuée aux élongations -OH et -NH indiquant la présence de groupements hydroxyle, polysaccharide, protéique et/ou amine. L'apparition de pics -OH peut également résulter d'une petite quantité de précipité d'hydroxyde de Cr(III) (Deng and Ting, 2005 ; Dhal et al., 2010).
- La bande à environ 2900 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation C-H du groupe alkyle (Karthik et al., 2017).
- Les bandes situées approximativement à 1600 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} sont attribuées à l'élongation -NH qui correspond aux groupements amide I et II de la liaison peptidique couplée à un anion -COO, respectivement (Wu et al., 2019).
- Les bandes à environ 1395 cm^{-1}, 1240 cm^{-1} et 1050 cm^{-1} correspondent aux groupes alcane, carboxyle et phosphoryle, respectivement (Doshi et al., 2007 ; Chen et al., 2012b).
- 900 cm^{-1} pourrait être due à la vibration Cr=O des espèces de Cr réduites (Biswas et al., 2018).

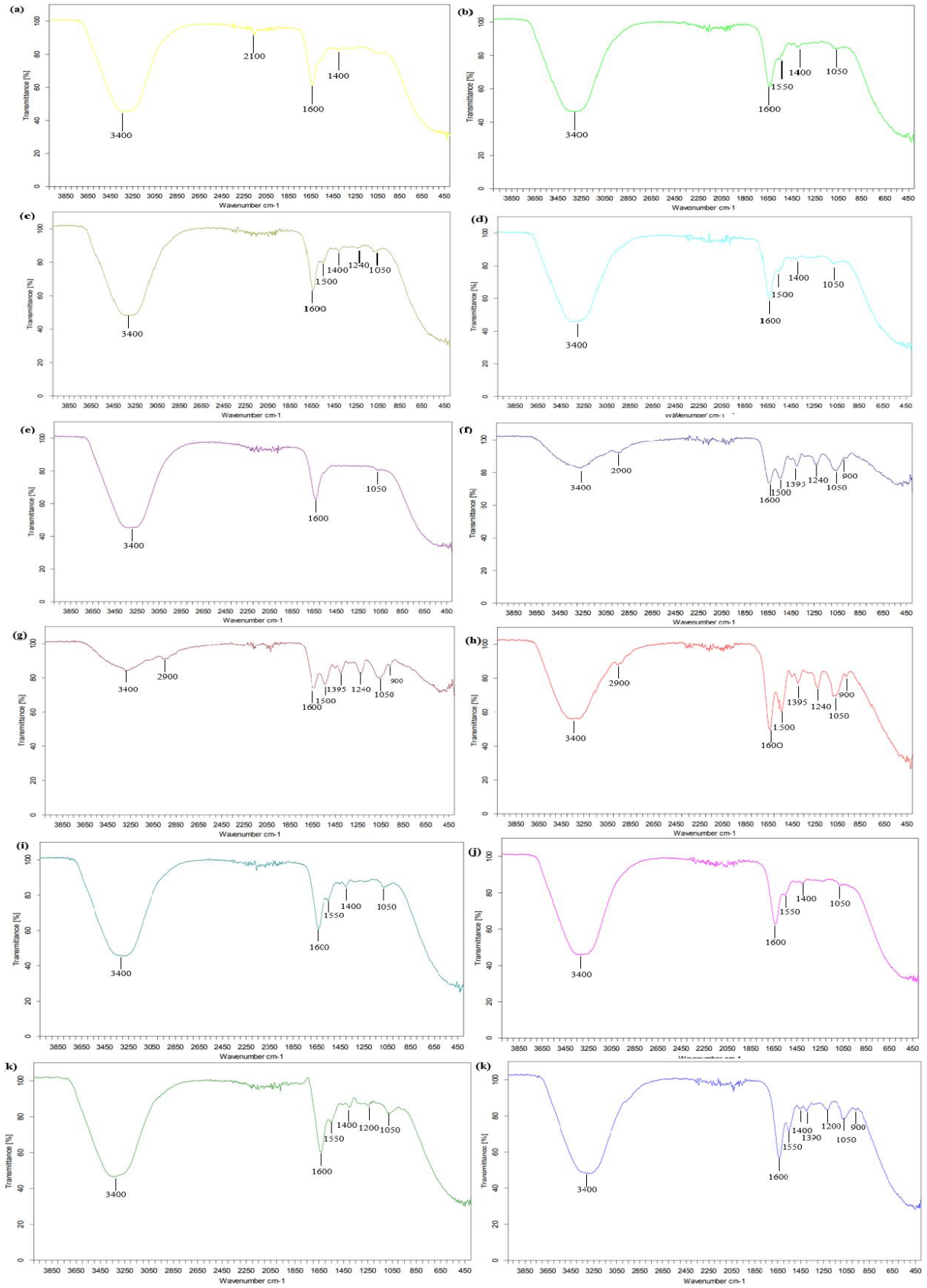


Figure 28 : Spectres IRTF des cellules témoins (**a**), (**c**), (**e**), (**g**), (**i**) et (**k**) et traitées (**b**), (**d**), (**f**), (**h**), (**j**) et (**l**) par 100 mg/L du Cr(VI) respectivement, pour *B. paraconglomeratum*, *S. aureus*, *B. safensis*, *B. pumilus*, *S. succinus* et *S. gallinarum*.

En effet, l'apparition de nouveaux pics ou des pics d'intensité et d'allongement différents dans les cellules traitées montre la liaison du chrome avec des groupes fonctionnels de la paroi bactérienne. La présence de groupements hydroxyle et carboxyle à la surface bactérienne indique l'interaction de ces groupements avec le Cr(VI) pour sa biosorption et/ou sa réduction (Karthik et al., 2017). Il convient de noter que les groupes hydroxyle et carboxyle ne sont pas seulement impliqués dans la réduction du Cr(VI), mais peuvent également jouer un rôle dans la liaison du Cr(III) à la paroi cellulaire (Mangaiyarkarasi et al., 2011). De plus, la présence de bandes amide, alcane et phosphoryle est typique des EPS, prouvant la présence de polysaccharides et de protéines également impliquées dans le processus de détoxification du Cr(VI) (Pradhan et al., 2019). Des résultats similaires ont été observés pour *Bacillus* sp. (Wu et al., 2019), *Bacillus* sp. (Zhu et al., 2019), *Bacillus* sp. (Tan et al., 2020), *Sporosarcina saromensis* W5 (Huang et al., 2021a) et *Rhodobacter sphaeroides* SC01 (Su et al., 2021). En conclusion, les groupes fonctionnels de surface cellulaire peuvent se coordonner avec le chrome pour réduire sa toxicité ou se lier aux précipités de Cr(III) (Kamnev, 2008 ; Arivalagan et al., 2014).

2. Etude de la réduction du Cr(VI) par les souches bactériennes

2.1. Réduction par les cellules perméabilisées et au repos « Resting cells »

Afin de mettre en évidence la réduction du Cr(VI) par les cellules au repos et perméabilisées des six bactéries étudiées, les cellules centrifugées ont été mises en solution soit dans un tampon phosphate de potassium (cellules au repos), ou dans du triton X-100 et du toluène (cellules perméabilisées). La réduction du Cr(VI) par les cellules au repos a été réalisée dans un tampon phosphate sans ajout de sources de carbone, pour montrer l'utilisation de ses réserves en donneurs d'électrons cellulaires afin de compléter la réduction (Wang and Shen, 1995). Cependant, la perméabilisation des cellules a été réalisée avec du triton X-100 et du toluène. Le Triton X est un détergent non ionique qui assure la perméabilisation cellulaire en solubilisant les protéines de la membrane interne (Naglak and Wang, 1990), tandis que le toluène est un solvant organique largement utilisé dans les expériences de perméabilisation, il crée des pores dans la membrane cellulaire en dissolvant les phospholipides, ce qui assure la libération des protéines.

Le **tableau 22** montre qu'après 6 h d'incubation à température optimale sous agitation (150 rpm), les cellules tuées par la chaleur, qui servaient de témoin, ont pu réduire de faibles

quantités de chrome hexavalent, résultat expliqué par la capacité des cellules à adsorber le Cr(VI) à la surface cellulaire, comme nous l'avons montré précédemment.

Les cellules perméabilisées de CRB-4 (*B. pumilus*) et CRB-5 (*S. succinus*) ont significativement réduit le Cr(VI), avec un taux de réduction d'environ 93 % pour une concentration initiale de 10 mg/L du Cr(VI) et de 66% et 62% pour la concentration de 25 mg/L, respectivement. Ces résultats montrent l'efficacité de la perméabilisation cellulaire qui assure un contact direct entre le Cr(VI) et les enzymes réductases internes.

Tableau 22 : Réduction des différentes concentrations initiales du Cr(VI) par les cellules perméabilisées et au repos des six souches bactériennes après 6 h d'incubation à température optimale.

	Croissance en **absence** du Cr(VI) % Cr(VI) résiduel		Croissance en **présence** du Cr(VI)* % Cr(VI) résiduel	
Cr(VI) (mg/L)	**10**	**25**	**10**	**25**
Cellules perméabilisées				
Témoin	90,96 ± 0,88	98,94 ± 0,29	92,24 ± 0,40	97,66 ± 0,29
CRB-1	19,16 ± 1,11	48,18 ± 2,47	22,37 ± 0,61	47,48 ± 0,22
CRB-2	42,88 ± 0,66	73,56 ± 0,86	49,29 ± 0,48	75,87 ± 2,00
CRB-3	49,93 ± 0,22	66,12 ± 0,88	51,85 ± 0,11	68,69 ± 0,51
CRB-4	6,98 ± 0,80	34,07 ± 0,69	10,83 ± 0,41	37,92 ± 1,50
CRB-5	6,98 ± 0,11	37,66 ± 0,72	7,43 ± 0,93	42,28 ± 0,96
CRB-6	43,52 ± 0,26	68,43 ± 1,61	41,40 ± 0,29	67,66 ± 0,44
Cellules au repos				
Témoin	92,24 ± 0,48	87,16 ± 0,22	94,80 ± 0,57	89,74 ± 0,55
CRB-1	14,04 ± 1,21	45,61 ± 2,56	14,67 ± 0,48	56,12 ± 1,77
CRB-2	0,00 ± 0,00	9,46 ±1,92	0,00 ± 0,00	13,56 ± 0,72
CRB-3	2,94 ± 0,46	39,71 ± 0,55	2,5 ± 0,33	38,98 ± 1,31
CRB-4	8,71 ± 0,89	41,00 ± 2,71	12,56 ± 1,27	41,25 ± 0,58
CRB-5	14,03 ± 1,07	57,41 ± 1,44	17,24 ± 0,96	55,10 ± 1,74
CRB-6	41,59 ± 0,61	62,17 ± 1,13	39,28 ± 0,53	63,61 ± 0,97

*Cellules cultivées en présence de 10 mg/L de Cr(VI).

La perméabilisation avec le Triton X-100 et le toluène a entraîné une réduction accrue du Cr(VI) par CRB-4 et CRB-5, indiquant que les protéines cytoplasmiques ont été libérées et que les deux souches ont réduit le Cr(VI) principalement par des réductases cytosoliques solubles et non par des réductases associées à la membrane cellulaire. Par conséquent, on peut conclure que la lyse cellulaire a joué un rôle important dans la réduction du Cr(VI) et que l'activité de la chromate réductase chez ces bactéries est soluble et non étroitement liée à la membrane. Des résultats similaires ont été rapportés par Wani et al. (2019), où des cellules perméabilisées de *Pseudomonas* sp. ont montré un taux de réduction plus élevé (84%) par rapport aux cellules au repos (75%), attribuant ce résultat à la forte pénétrabilité du Cr(VI), offerte par la perméabilisation, assurant ainsi une bioréduction élevée.

Aussi, Ishibashi et al. (1990), Pal et al. (2005), Elangovan et al. (2006), Soni et al. (2013) et Ge et al. (2015) ont observé que l'activité de la chromate réductase était associée à la protéine soluble et non aux protéines membranaires chez *Pseudomonas putida*, *Bacillus sphaericus* AND 303, *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* et *Brevibacterium* sp., respectivement. Desai et al. (2008a) ont suggéré qu'une chromate réductase soluble catalyse la réduction du Cr(VI) par P*seudomonas* sp. G1DM21 en transférant un électron initial au Cr(VI) pour former le Cr(V) intermédiaire, suivi d'un transfert de deux électrons pour la formation de Cr(III).

Cependant, les cellules au repos de *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2) et *B. safensis* (CRB-3) ont présenté une efficacité de réduction remarquable en comparaison avec les cellules perméabilisées. Pour la concentration de 10 mg/L, un taux de réduction de 86%, 100% et 97% a été enregistré, alors que pour 25 mg/L, il est de l'ordre de 54%, 91% et 60%, respectivement pour CRB-1, CRB-2 et CRB-3. Ces résultats montrent que ces bactéries ont la capacité d'éliminer le Cr(VI) en impliquant des protéines membranaires. Les cellules de *Serratia proteamaculans* au repos ont également montré une efficacité de réduction plus élevée par rapport aux cellules perméabilisées (Joutey et al., 2014). Toutefois, les cellules perméabilisées et au repos de la souche *S. gallinarum* (CRB-6) pourraient réduire efficacement 10 mg/L de Cr(VI), avec un taux de réduction d'environ 56% et 58%, respectivement, et avec 32% et 37% pour la concentration de 25 mg/L, respectivement, donc aucune différence significative entre les deux types de cellules n'a été remarquée. De même, Zeng et al. (2019) ont rapporté que le taux de réduction de 10 mg/L de Cr(VI) par les cellules d'*Oceanobacillus oncorhynchi* W4 au repos et perméabilisées était presque le même après 6 h d'incubation de l'ordre de 75,9% et 76,9%, respectivement.

Pour les six CRB, nous notons qu'il n'y a pas de différence remarquable d'efficacité de réduction entre les cellules cultivées en l'absence ou en présence de Cr(VI), démontrant que la

présence de Cr(VI) n'est pas requise pour la production de la chromate réductase. Par conséquent, l'activité réductase de ces bactéries est constitutive. La chromate réductase est également exprimée de manière constitutive chez : *Bacillus* sp. G1DM20 (Desai et al., 2008b), *Streptomyces* sp. MC1 (Polti et al., 2010), *B. subtilis* (Mangaiyarkarasi et al., 2011) et *Leucobacter chromiireducens* (Joutey et al., 2016). Alors que chez *Bacillus* sp. JDM-2-1, *Staphylococcus capitis* (Zahoor and Rehman, 2009), *Bacillus methylotrophicus* (Mala et al., 2015) et *Stenotrophomonas maltophilia* (Baldiris et al., 2018), l'expression de cette enzyme est induite.

Les expériences sur les cellules au repos et perméabilisées ont fourni la meilleure preuve que le processus de réduction du Cr(VI) par les bactéries étudiées est enzymatique constitutif précédé d'une adsorption.

2.2. Réduction par les fractionnements cellulaires

Selon des recherches sur les cellules au repos et les cellules perméabilisées, la réduction du Cr(VI) par les six CRB étudiées est un processus à médiation enzymatique. Pour localiser précisément l'activité chromate réductase, des fractions subcellulaires comprenant des fractions extracellulaires, cytosoliques et membranaires ont été préparées en l'absence et en présence de 10 mg/L de Cr(VI).

Les fractions extracellulaires des six souches bactériennes n'ont donné aucune réduction significative, à l'exception de la fraction extracellulaire de *S. gallinarum* (CRB-6) qui a donné un taux de réduction d'environ 11%, ce qui pourrait être attribué à la libération d'enzymes réductrices de Cr(VI) qui sont délibérément produites par les cellules et exportées vers l'environnement extérieur pour réduire extracellulairement le Cr(VI) en Cr(III) (Cheung and Gu, 2007). La même découverte a été rapportée chez d'autres bactéries, telles que *Staphylococcus aureus* LZ-01 (Zhang et al., 2014), *Bacillus amyloliquefaciens* CSB 9 (Rath et al., 2019) et *Bacillus* sp. (Wu et al., 2019). L'absence d'activité chromate réductase dans la fraction extracellulaire du reste des bactéries étudiées prouve que la réduction du Cr(VI) se produit principalement dans la fraction membranaire et/ ou la fraction cytoplasmique.

Les résultats du **tableau 23** démontrent que *S. gallinarum* (CRB-6) est capable de réduire le Cr(VI) principalement par la fraction cytoplasmique avec un taux d'environ 64% pour une concentration de 25 mg/L après 6 h d'incubation. Il en va de même pour *B. pumilus* (CRB-4) et *S. succinus* (CRB-5) qui ont présenté une réduction intracellulaire remarquable d'environ 78% et 74%, respectivement. Alors que les fractions membranaires de ces bactéries ont donné une réduction moyenne. En effet, le Cr(VI) existe principalement sous la forme de CrO_4^{2-}

dont la structure ressemble au sulfate (SO_4^{2-}). Ainsi, le Cr(VI) peut facilement pénétrer dans les cellules bactériennes par les canaux de transport des sulfates. Puis, dans la solution cytosolique, le Cr(VI) est réduit en Cr(III) (Karthik et al., 2016). Une activité de chromate réductase intracellulaire a également été rapportée pour *Bacillus* sp. SUCR44, *Bacillus thuringiensis* SUCR186, *Bacillus subtilis* SUCR188 (Soni et al., 2013), *Bacillus amyloliquefaciens* (Das et al., 2014), *Acinetobacter* sp. (Jin et al., 2017), *Stenotrophomonas maltophilia* (Baldiris et al., 2018) et *Sporosarcina saromensis* W5 (Huang et al., 2021a).

Tableau 23 : Réduction de 25 mg/L du Cr(VI) par la fraction cytosolique et membranaire des six souches bactériennes après 6 h d'incubation à température optimale.

	Croissance en **absence** du Cr(VI) % Cr(VI) résiduel		Croissance en **présence** du Cr(VI)* % Cr(VI) résiduel	
Temps de sonication (min)	**10**	**20**	**10**	**20**
Fraction cytosolique				
Témoin	95,87 ± 2,91	96,12 ± 3,10	94,84 ± 2,31	95,61 ± 2,77
CRB-1	86,94 ± 1,20	88,82 ± 2,47	81,48 ± 1,97	85,10 ± 2,35
CRB-2	82,23 ± 0,66	89,28 ± 0,86	87,43 ± 2,50	88,69 ± 1,53
CRB-3	65,87 ± 3,46	76,38 ± 1,33	64,07 ± 2,66	70,47 ± 2,74
CRB-4	22,02 ± 1,77	26,38 ± 3,52	32,28 ± 1,60	35,61 ± 2,03
CRB-5	26,64 ± 2,70	44,07 ± 2,77	32,79 ± 0,88	47,66 ± 1,60
CRB-6	35,53 ± 1,66	37,64 ± 1,40	37,48 ± 2,23	38,17 ± 1,60
Fraction membranaire				
Témoin	94,84 ± 2,03	96,12 ± 1,17	94,84 ± 1,60	96,12 ± 2,91
CRB-1	41,25 ± 2,35	44,61 ± 1,77	43,30 ± 2,15	45,46 ± 1,08
CRB-2	31,97 ± 2,10	33,07 ± 2,07	30,43 ± 1,79	34,82 ± 2,10
CRB-3	35,10 ± 0,44	51,51 ± 2,91	34,07 ± 1,33	52,53 ± 1,53
CRB-4	68,18 ± 1,60	73,56 ± 1,93	69,71 ± 1,33	75,35 ± 1,93
CRB-5	79,46 ± 0,76	80,23 ± 1,53	82,02 ± 1,17	83,05 ± 1,17
CRB-6	81,25 ± 1,60	86,64 ± 1,17	82,53 ± 2,77	88,43 ± 1,40

*Cellules cultivées en présence de 10 mg/L de Cr(VI).

Chez *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2) et *B. safensis* (CRB-3), il s'est avéré que la réduction du Cr(VI) est principalement réalisée par des protéines membranaires, confirmant les résultats obtenus par les cellules au repos. Un taux de réduction de 59%, 68% et 65% a été enregistré par la fraction membranaire de ces trois bactéries, respectivement. Des études antérieures ont montré que la réduction membranaire existe dans différentes bactéries, l'exemple d'*Amphibacillus* sp. KSUCr3 (Ibrahim et al., 2012), *Oceanobacillus oncorhynchi* W4 (Zeng et al., 2019) et *Rhodobacter sphaeroides* SC01 (Su et al., 2021). A noté que les cellules fractionnées pendant 10 min donnaient un taux de réduction légèrement supérieur à celles de 20 min, ce qui montre que le temps de sonication doit être pris en considération. De plus, la régulation constitutive de la chromate réductase dans les six CRB est bien confirmée.
D'après ces résultats, on peut conclure que l'élimination du Cr(VI) par toutes les bactéries étudiées est un mécanisme enzymatique constitutif commençant par l'adsorption du chrome sur la surface cellulaire, puis sa réduction membranaire par *B. paraconglomeratum* (CRB-1), *S. aureus* (CRB-2) et *B. safensis* (CRB-3), et intracellulaire par *B. pumilus* (CRB-4), *S. succinus* (CRB-5) et *S. gallinarum* (CRB-6) et précipitation du Cr(III) sur la paroi cellulaire.

3. Expression et identification de la chromate réductase

La chromate réductase est connue pour médier la réduction de la forme hexavalente la plus toxique, cancérigène et mutagène du chrome en sa forme moins toxique et moins soluble ; la forme trivalente. Pour chaque bactérie, les cellules ont été cultivées en l'absence et en présence de 100 mg/L du Cr(VI) et la fraction subcellulaire qui a donné une réduction significative a été utilisée pour la recherche et la détermination du poids moléculaire de la chromate réductase à l'aide d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et les résultats sont présentés dans la **figure 29**.

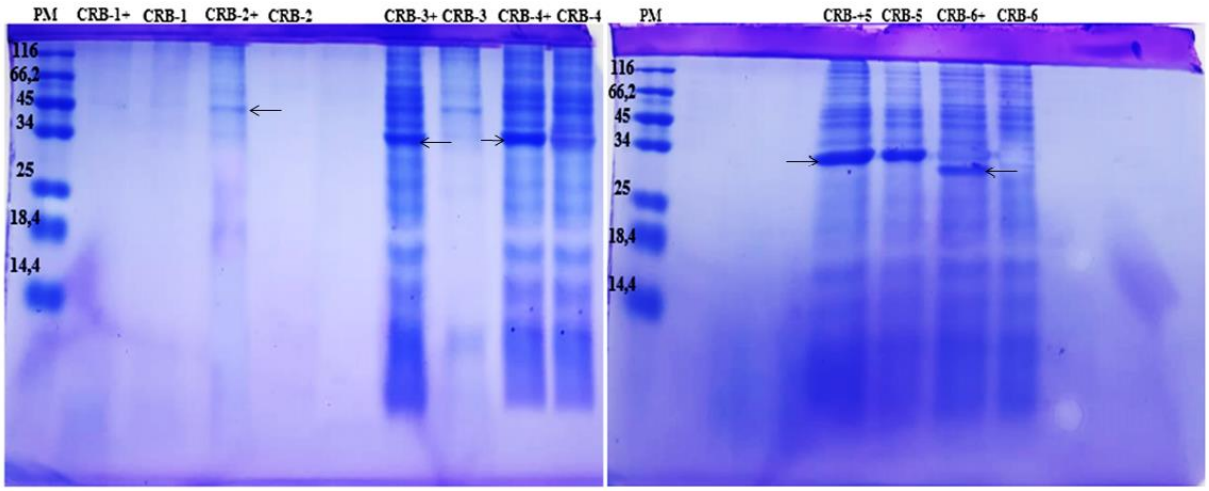


Figure 29 : Gel SDS-PAGE des protéines totales des souches bactériennes résistantes au Cr(VI). **PM** : marqueur protéique ; CRB-1^+ et CRB-2^+, CRB-3^+, CRB-4^+, CRB-5^+ et CRB-6^+ traitées par 100 mg/L de Cr(VI) ; CRB-1, CRB-2, CRB-3, CRB-4, CRB-5 et CRB-6 non traitées de *B. paraconglomeratum*, *S. aureus*, *B. safensis*, *B. pumilus*, *S. succinus* et *S. gallinarum*, respectivement.

La comparaison des profils montre qu'une protéine de poids moléculaire compris entre 30 et 35 kDa est exprimée sur gel SDS-PAGE en présence de chrome pour les souches bactériennes *S. aureus* (CRB-2), *B. safensis* (CRB-3), *B. pumilus* (CRB-4) et *S. gallinarum* (CRB-6). Cependant, le profil de *S. succinus* (CRB-5) avec et sans le chrome montre une bande d'environ 32 kDa. Alors qu'aucune bande n'a été détectée dans les deux profils de *B. paraconglomeratum* (CRB-1).

La protéine exprimée dans les différents profils en présence de 100 mg/L du Cr(VI) peut éventuellement être responsable de la réduction de chromate par les souches bactériennes (Thacker and Madamwar, 2005). Il a été signalé chez *Pseudomonas aeruginosa* (Ganguli and Tripathi, 2001) et *Ochrobactrum* sp. (Thacker and Madamwar, 2005) qu'une protéine d'un poids moléculaire de 30 kDa s'exprime en présence de chrome et qui a été attribuée à la chromate réductase. Alors que chez *Pseudomonas ambigua* (Park et al., 2000), *Staphylococcus capitis* (Zahoor and Rehman, 2009), *Alishewanella* sp. WH16-1 (Xia et al., 2018) et *Stenotrophomonas maltophilia* (Baldiris et al., 2018), la chromate réductase est d'un poids moléculaire de 25 kDa sur SDS-PAGE. Tandis que le poids moléculaire de la même protéine a été rapporté à environ 36 kDa chez *Thermus scotoductus* SA-01 (Opperman et al., 2008b) et 26 kDa chez *Serratia* sp. S2 (Zhou et al., 2017b). La différence de poids moléculaire de la chromate réductase entre les genres et même les espèces bactériennes

montre que cette enzyme peut être complètement différente d'un organisme à l'autre (Thacker and Madamwar, 2005).

V. Traitement des effluents de tanneries contaminés par le Cr(VI)

L'industrie des tanneries est l'un des secteurs traditionnels les plus importants de l'économie marocaine (Metarfi et al., 2018). Par conséquent, la consommation d'énormes quantités d'eau lors de toutes les opérations de transformation du cuir et le rejet d'effluents non traités entraînent de très graves problèmes, notamment sur la qualité de l'eau et la santé humaine et sont l'un des principaux pollueurs qui influencent négativement l'équilibre écologique (Hairuddin et al., 2019).

Au cours de cette étude, des échantillons des effluents de tanneries de la zone industrielle Ain Nokbi située dans la ville de Fès ont été prélevés. D'une part pour évaluer leur qualité physico-chimique et d'autre part pour les bioremédier avec nos souches bactériennes sélectionnées, séparément et en consortium.

1. Caractérisation physico-chimique des effluents de tanneries

Les résultats des analyses physico-chimiques des effluents de tanneries avant traitement sont regroupés dans le **tableau 24**. Certaines valeurs des différents paramètres physico-chimiques obtenues dans cette étude se sont avérées supérieures aux valeurs admissibles recommandées pour les rejets industriels.

Tableau 24 : Caractéristiques physico-chimiques des effluents de tanneries de la zone industrielle Ain Nokbi en comparaison avec les valeurs de la norme marocaine.

Paramètres	Effluent de tanneries	Normes Marocaines pour les rejets dans les eaux de surface et souterraines*
Odeur	Désagréable	-
Couleur	Bleu foncé	-
T (°C)	24	30
pH	8,6 ± 0,02	5,5-9,5
CE 25°C (dS/m)	16,24 ± 0,00	-
MES (mg/L)	5280	100
NO_3^- (mg/L)	19,36 ± 0,35	-
SO_4^{2-} (mg/L)	4875,609 ± 43,31	600
NTK (mg/L)	160,792 ± 2,18	40
DCO (mg d'O_2/L)	9160,984 ± 87,18	500
Ions métalliques (mg/L)		
Ca	229,99	-
Mg	167,80	-
Na	1898,96	-
Cr	31,524	2
Cd	< 0,01	0,25
Co	< 0,01	0,5
Ni	< 0,01	5
Pb	0,0853	1
Cu	< 0,01	2
Fe	< 0,01	5
Zn	0,458	5

* Normes Marcaines: State Secretariat for Water and Environment, Moroccan Laws Relating to the Environment, (22 Janvier 2018).

Les effluents de tanneries, collectés à partir de la zone industrielle d'AIN NOKBI à Fès, se caractérisent par une odeur fortement désagréable et une couleur bleue foncée. Cette odeur pourrait être due à la présence de sulfures, tandis que les colorants utilisés pour colorer le cuir

pourraient être à l'origine de sa couleur bleue foncée, ce qui bloque la pénétration de la lumière du soleil dans les masses d'eau réceptrices et réduit l'activité photosynthétique, la teneur en oxygène dissous et affecte ainsi négativement la vie aquatique (Mahmoud et al., 2013 ; Saxena et al., 2016 ; Bharagava et al., 2018). En effet, les eaux usées de couleur foncée provenant de tanneries présentent divers risques graves pour la santé des animaux vertébrés et invertébrés dans les plans d'eau récepteurs (Rocha and De Oliveira, 2017).

L'effluent était caractérisé par un pH alcalin (8,6) dans la norme marocaine. Des effluents de tanneries présentant des caractéristiques de pH similaires ont été trouvés dans des travaux antérieurs (Hussain et al., 2010 ; Alemu et al., 2019). La valeur moyenne de la CE, qui exprime la concentration ionique, atteint 16,24 dS/m indiquant que l'effluent est riche en minéraux. Par conséquent, cette valeur élevée est due à l'utilisation de quantités importantes de sels lors du processus de fabrication du cuir (Esmi, 2014). La concentration moyenne de MES, qui présente toutes les matières organiques et minérales insolubles dans l'eau, qui la troublent et diminue sa luminosité, est très élevée, autour de 5280 mg/L, ce qui dépasse largement la norme (100 mg/L), expliquant de plus l'aspect trouble et fortement coloré de l'effluent (Ben Abou and El Haji, 2014).

Les valeurs fortement élevées de DCO (9160,984 mg/L), de SO_4^{2-} (4875,609 mg/L) et de NTK (160,792 mg/L) dans l'effluent brut pourraient être dues à la forte teneur en matière organique (principalement due à la matières biogéniques des peaux), minéraux dissous, sels, sulfate de chrome (agent de tannage) et sulfate d'aluminium (utilisé lors de l'étape de déchaulage) et généralement à l'utilisation excessive de produits chimiques lors des différents processus de tannage, qui sont responsables de graves pollutions des eaux et des sols (Aboulhassan et al., 2008). Ces valeurs élevées de DCO, de sulfate et d'azote total dans les effluents des tanneries ont également été rapportées par plusieurs chercheurs lors de la caractérisation et le traitement de ces eaux usées (El Khalfaouy et al., 2017 ; Bharagava et al., 2018 ; El Mouhri et al., 2020). Cependant, la concentration de NO_3^- dans l'effluent non traité était d'environ 19,36 mg/L, cette valeur est faible par rapport aux normes marocaines pour les rejets d'eaux usées. Les résultats obtenus en termes d'ions nitrates étaient cohérents avec ceux de certains auteurs (Omor et al., 2019 ; Vijayaraj et al., 2019).

Les concentrations de métaux détectées dans l'effluent brut montrent que le chrome total a une valeur hors norme qui est d'environ 31,524 mg/l. Ce résultat est attendu car le chrome est l'élément essentiel lors de l'étape de tannage (Aboulhassan et al., 2008). De plus, la concentration de Na est élevée, ce qui est dû à la forte utilisation de sel pour la conservation

des peaux d'animaux pendant le processus de tannage (Mannucci et al., 2010 ; Lofrano et al., 2013). D'autres éléments tels que : Ca, Mg, Cd, Co, Ni, Pb, Cu, Fe et Zn sont présents mais en faible quantité, conformément aux normes marocaines de rejet.

En général, les caractéristiques physico-chimiques des effluents des tanneries ne répondent pas aux Normes Marocaines de rejet et sont difficilement biodégradables, témoignant d'un caractère complexe de l'effluent. Ces eaux nécessitent donc un traitement économique et en même temps écologique capable de rendre acceptables les normes générales de rejet. Ainsi, le choix de la bioremédiation à l'aide de bactéries résistantes/réductrices du chrome hexavalent apparaît comme une méthode de traitement rentable et efficace.

2. Traitement de l'effluent des tanneries par les souches bactériennes séparément et en consortium

Le traitement des effluents de tanneries par un procédé biologique apparaît difficile, car ils sont fortement chargés en produits chimiques et en métaux lourds et présentent un environnement toxique pour la biomasse microbienne. Dans cette étude, l'utilisation de souches bactériennes séparées et en consortium a été réalisée pour l'élimination d'un maximum de polluants et en même temps pour comparer l'efficacité du traitement.

2.1. Evolution du pH

Comme nous l'avons montré auparavant, le pH est un facteur clé qui influence largement la croissance bactérienne et donc la réduction du Cr(VI). Pour cela nous avons poursuivi la variation du pH avant et après traitement avec les six souches bactériennes séparées et en consortium et les résultats sont illustrés dans la **figure 30**.

Une augmentation du pH a été enregistrée après traitement de l'effluent par les souches bactériennes, où il a varié de 8,6 à un maximum de 9,7 par *S. succinus* (CRB-5) après 5 jours et à 9,9 par le **consortium 1** formé de ***B. paraconglomeratum* + *B. safensis* + *B. pumilus***, après 3 jours de traitement. Cette augmentation du pH est principalement due à la prolifération et à l'activité microbienne qui provoque la dégradation des protéines et par conséquent la libération d'ions NH_4^+ (Aissam, 2003). La dénitrification pourrait encore expliquer l'élévation du pH au sein de l'effluent traité suite à la libération de groupements OH-.

De plus, la dégradation de la matière organique portant des groupements COO^- et/ou OH^- permet la libération d'ions OH^-, favorisant ainsi une augmentation du pH (Ercoli and Ertola, 1983). Ce phénomène a également été observé par d'autres auteurs (Tadesse et al., 2004).

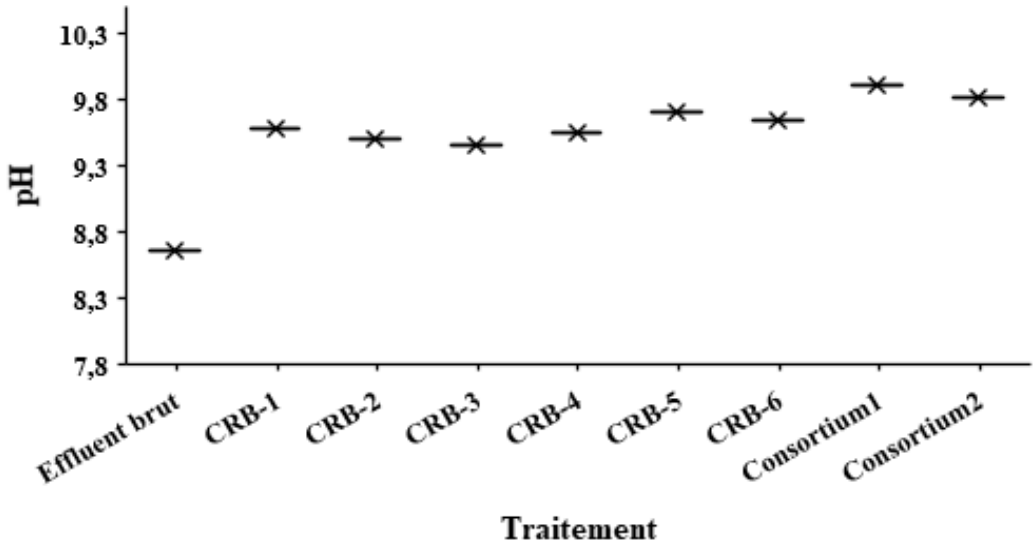


Figure 30 : Évolution du pH de l'effluent après traitement par les six souches et les consortiums bactériens.

2.2. Réduction des nitrates

La concentration initiale en nitrate dans l'effluent brut est d'environ 19,36 mg/L, cette valeur a été réduite à un maximum de 2,614 mg/L par *B. pumilus* (CRB-4) et 2,256 mg/L par le **consortium 2** formé de ***S. aureus, S. succinus* et *S. gallinarum***, ce qui représentait plus de 88% de réduction, sous traitement aérobie (**Figure 31**).

Un résultat comparable d'élimination des nitrates des effluents de tanneries a été rapporté pour *Bacillus* sp. et *Cronobacter* sp., (Chandra et al., 2011) et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Vijayaraj et al., 2019). Après 5 jours, le traitement des eaux usées de tanneries modernes de la zone industrielle Doukkarat située dans la ville de Fès, par le réacteur séquentiel discontinu a montré une efficacité de réduction significative des ions nitrates allant de 12,85 à 0,7 mg/L (Elkarrach et al., 2020a). Ils ont expliqué ce résultat par la dénitrification, dans laquelle le nitrate est réduit en azote gazeux par des bactéries dénitrifiantes, notamment *Pseudomonas* (Tsuneda et al., 2006). Généralement, l'élimination des nitrates en conditions aérobies est dominée par le métabolisme assimilateur ; au contraire, dans des conditions anoxiques, la matière organique donne des électrons et le nitrate agit comme un accepteur terminal d'électrons pour la génération d'énergie (Kuroda et al., 1997). Il

a été rapporté que dans des conditions anaérobies, la quantité de réduction de nitrate diminue lorsque des concentrations de chrome plus élevées prévalent (Kourtev et al., 2009 ; Chovanec et al., 2012).

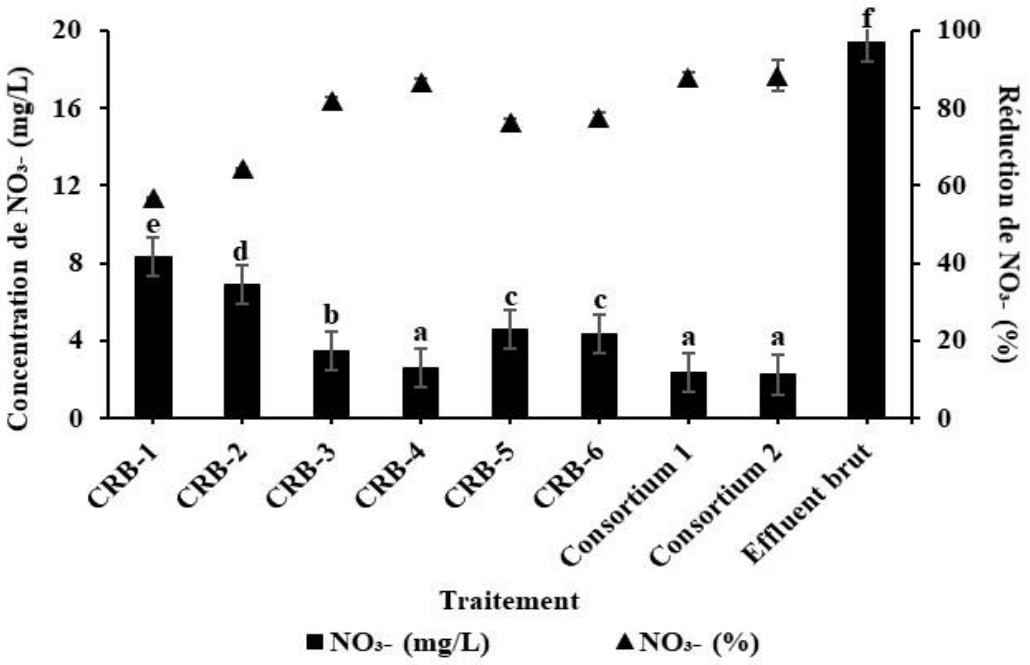


Figure 31 : Réduction des ions nitrates des effluents de tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

2.3. Réduction d'azote Kjeldhal (NTK)

Les nutriments rejetés dans l'eau, notamment l'azote, le nitrate et le phosphore, contribuent à l'augmentation de la production d'une biomasse algale excessive et déséquilibrée, entraînant une accumulation de la matière organique, une diminution de la pénétration de la lumière et une eutrophisation des eaux de surfaces (Smith et al., 1999 ; Anderson et al., 2002 ; Ma et al., 2008).

En effet, l'azote Kjeldhal ne représente pas la totalité de l'azote, mais uniquement l'ensemble de ses formes réduites organiques et ammoniacales. L'azote peut avoir un caractère minéral ou organique et il se présente sous quatre formes essentielles : l'azote organique, les ions ammonium (NH_4^+), les nitrates (NO_3^-) et les nitrites (NO_2^-) (Hayzoun, 2014).

La **figure 32** représente la réduction des composés azotés (NTK) dans l'effluent bioremédié en comparaison avec le brut. Après 5 jours de traitement avec les bactéries séparées, la souche *B. pumilus* (CRB-4) a montré une réduction maximale de NTK de 160,792 mg/L à 37,350

mg/L, avec un taux de réduction de 76,77%. Alors qu'après 3 jours de traitement avec les consortiums bactériens, cette concentration a été réduite à 25,609 mg/L et à 23,493 mg/L, soit un taux de réduction de 84,057% et 85,385%, respectivement pour le consortium 1 et 2. Ainsi, les consortiums bactériens ont pu réduire la concentration de NTK dans l'effluent traiter afin qu'elle soit proche de la norme de rejet marocaine (40 mg/L).

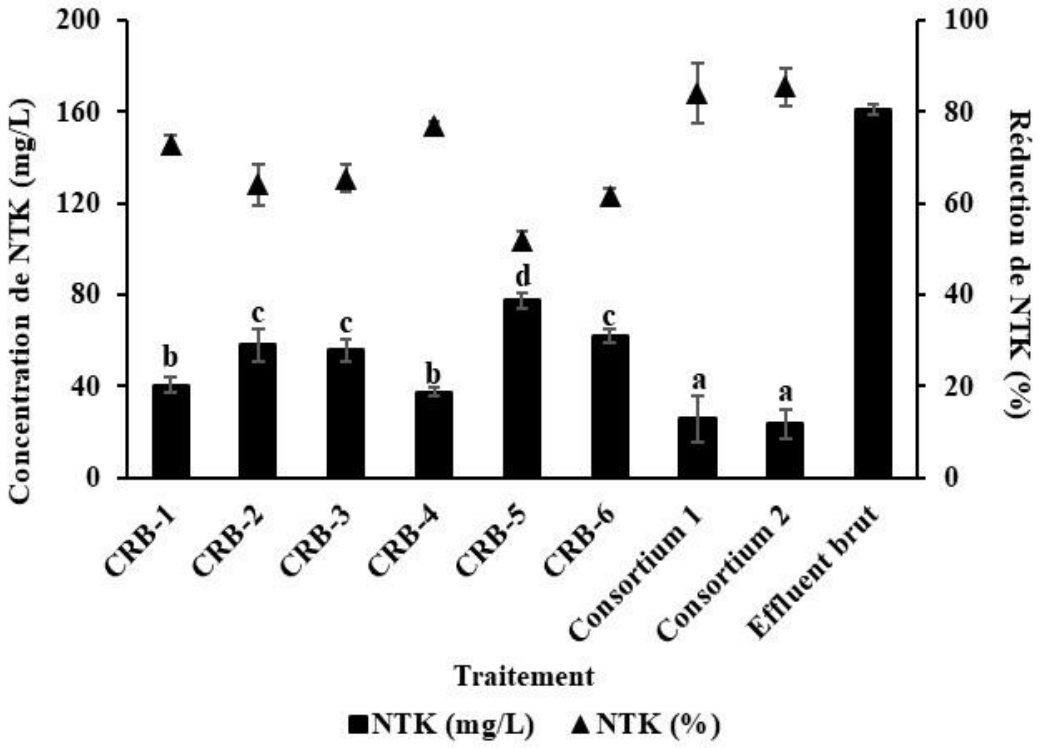


Figure 32 : Réduction de l'azote total d'effluent des tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5 %, LSD-Fisher).

Ces résultats obtenus prouvent la capacité de nos souches bactériennes à éliminer la pollution azotée. Le NTK pourrait être éliminé par les bactéries, qui pourraient avoir une grande capacité à convertir l'azote organique et ammoniacal en azote gazeux par des réactions de nitrification et de dénitrification (Elkarrach et al., 2021).

Elkarrach et al. (2020a) ont confirmé que l'élimination de l'azote des effluents de tannerie par un traitement biologique pourrait être liée à la réaction de nitrification, dans laquelle l'azote est oxydé en nitrate. Cette oxydation pourra être réalisée par nitrification grâce aux microorganismes présents dans la boue activée, notamment *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, utilisée dans le traitement.

2.4. Réduction des sulfates

Les fortes concentrations de sulfates présentes dans les effluents des tanneries sont principalement dues au tannage minéral qui prédomine dans les tanneries modernes, où plus de 80% des peaux sont traitées par le sulfate de chrome (Ouryachi, 1999 ; Hayzoum, 2014).

La **figure 33** montre que les bactéries séparées et en consortiums ont donné une réduction satisfaisante des ions sulfates. La concentration initiale de SO_4^{2-} dans l'effluent brut était d'environ 4875,609 mg/L, après traitement par les six souches, *B. safensis* (CRB-3) a montré une diminution significative de cette teneur jusqu'à 527,097 mg/L, soit un taux d'abattement de 89,19%. Malgré ce taux de réduction remarquable, l'effluent traité par les souches séparées est toujours en dehors de la norme marocaine (600 mg/L). Cependant, après 3 jours de traitement, les consortiums bactériens ont donné des résultats encourageants, où la concentration en sulfates atteint 328,913 mg/L et 319,14 mg/L, avec une réduction de 93,25% et 93,45%, respectivement pour le consortium 1 et 2. Par conséquent, ces valeurs correspondent à la réglementation marocaine.

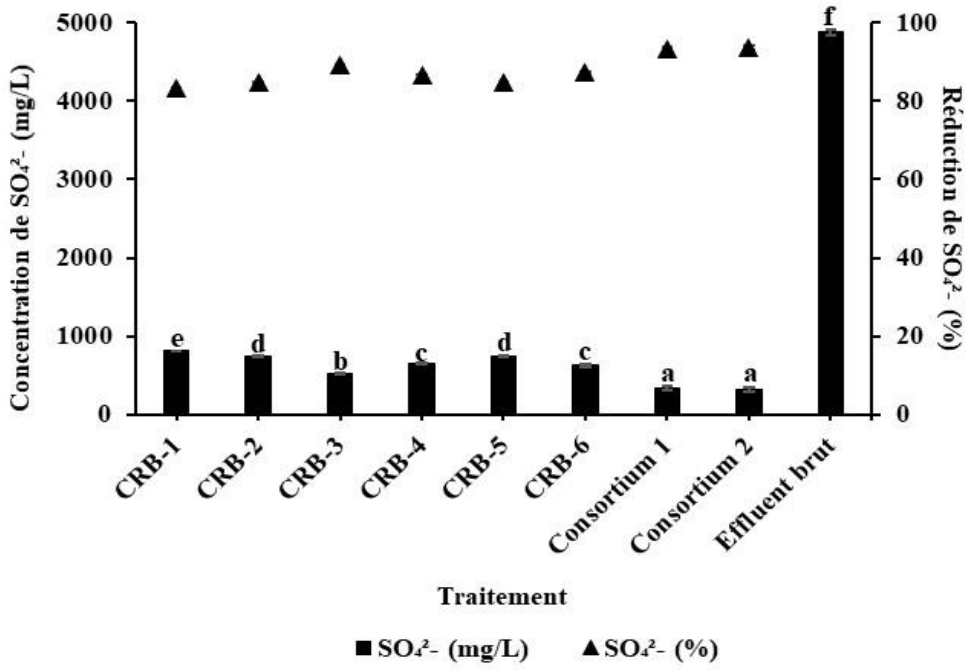


Figure 33 : Réduction des ions sulfates des effluents de tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

Le sulfate est utilisé par les bactéries pour diverses fins à travers deux mécanismes différents ; premièrement, dans l'eau oxygénée, plusieurs bactéries utilisent le soufre pour la réduction assimilatrice de sulfate, dans laquelle il est incorporé dans les composants cellulaires comme

les acides aminés soufrés et les protéines, on parle alors d'une réduction anabolique. Deuxièmement, en milieu anoxique, la réduction dissimulatrice des sulfates par les bactéries sulfato-réductrices conduit à la formation de sulfure d'hydrogène (H_2S) qui est expulsé vers l'extérieur, cette forme est très impliquée dans le processus de fixation des ETM dans les sédiments (Schulze and Mooney, 1994 ; Morse and Luther, 1999 ; Billon et al., 2002).

En effet, l'élimination simultanée du sulfate et du chrome pourrait également s'expliquer par la voie de réduction du chrome induite par la sulfurogenèse, dans laquelle le chrome est réduit par le sulfure généré par la réduction biologique du sulfate (Qian et al., 2016). Par conséquent, lorsque le sulfate est réduit, cela entraîne une diminution de la concentration en chrome dans les effluents de la tannerie. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres chercheurs (Tadesse et al., 2016 ; Vijayaraj et al., 2018).

2.5. Réduction de la DCO

La **figure 34** illustre l'efficacité des six souches et des consortiums bactériens dans la réduction de la DCO des effluents de tanneries. La réduction maximale de la DCO a été observée avec *B. pumilus* (CRB-4), où elle a passé de 9160,984 mg/L à 4332,824 mg/L, soit un taux de réduction de 66,11 %, après 5 jours de traitement. Alors que pour les 2 consortiums, elle est de l'ordre de 2539,883 mg/L et 2151,603 mg/L, avec un taux d'élimination de 79,24% et 77,73%, respectivement pour le consortium 1 et 2. Cependant, l'effluent traité est toujours en dehors de la norme marocaine de rejet pour la DCO (500 mg d'O_2/L), ce qui nécessite probablement une charge bactérienne plus élevée et un temps de traitement plus long. Des résultats similaires ont été rapportés par Ganesh et al. (2006) lors de la biodégradation des eaux usées de tannerie par un réacteur discontinu.

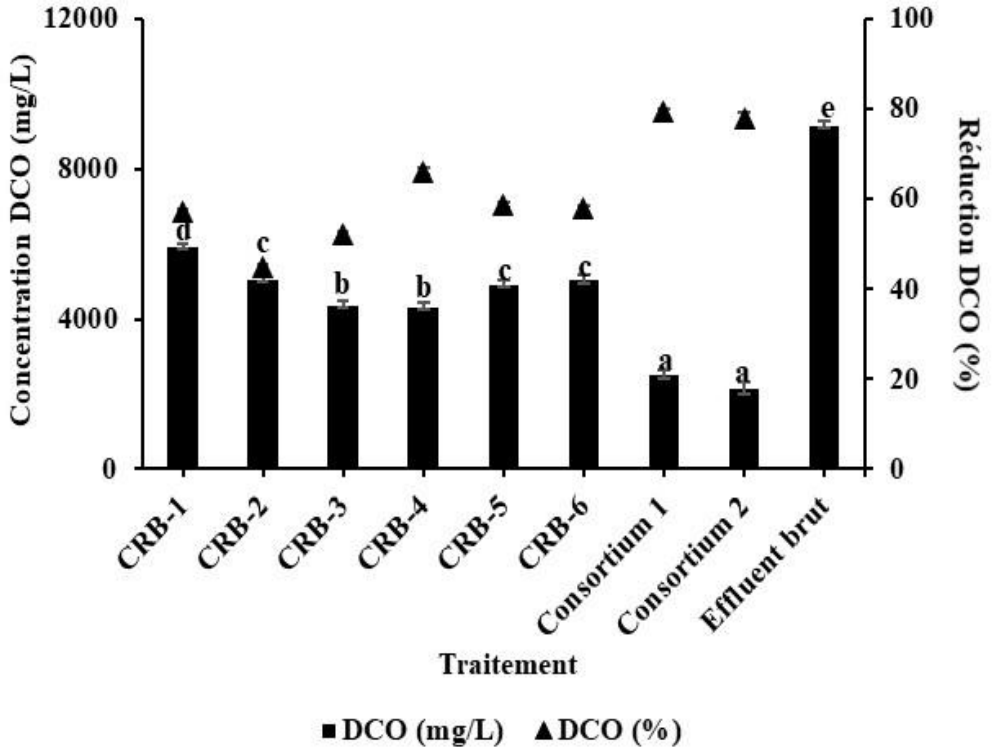


Figure 34. Réduction de la DCO d'effluent de tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5 %, LSD-Fisher).

Dans la présente étude, toutes les souches testées ont entraîné une réduction significative de la DCO des effluents de tanneries, ce qui pourrait être dû à l'utilisation des substances organiques dissoutes comme source de carbone par les cultures bactériennes pour leur croissance et leur prolifération (Shruthi et al., 2012 ; Verma et al., 2015). Achraf et al. (2018) ont rapporté une diminution de la DCO des effluents de tanneries après inoculation avec *Microbacterium arborescens* et *Bacillus aquimaris,* avec un taux de réduction de 63% et 24% respectivement après 9 jours de traitement. Gidhamaari et al. (2012) ont également signalé une diminution de la DCO (65%) des effluents de tanneries avec l'utilisation de *Pseudomonas* sp. au 15ème jour d'incubation. Dans une autre étude, *Bacillus* sp. a montré une grande efficacité de réduction de la DCO avec un pourcentage de 88% (Noorjahan, 2014).

L'efficacité des consortiums bactériens a été davantage prouvée, où plus de 80% de la DCO des effluents de tanneries ont été éliminés par des consortiums mixtes de *Bacillus flexus, Exiguobacterium homiense, Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Sivaprakasam et al., 2008).

2.6. Réduction du Cr(VI)

Généralement, les eaux usées des tanneries contenaient des niveaux élevés du chrome, car la plupart des tanneries sont engagées dans un processus de tannage au chrome. De sérieuses préoccupations concernant la toxicité des composés du chrome nécessitent la récupération et la réutilisation du chrome des tanneries ou sa réduction à sa forme moins toxique (Cr(III)) (Yamamoto et al., 1993). Pour survivre en présence de chrome, les bactéries doivent le détoxifier, ce qui se fait soit par biosorption, réduction et/ou accumulation à l'intérieur des cellules (Fujie et al., 1994).

Les six souches bactériennes de cette étude ont été efficaces dans la réduction du Cr(VI) présent dans les effluents de tanneries et ont démontré une élimination de plus de 70% (**Figure 35**). *B. safensis* (CRB-3) et *B. pumilus* (CRB-4) l'ont réduit à un maximum de 98% après 5 jours de traitement. Ce taux de réduction est supérieur à celui trouvé dans une étude précédente (Vijayaraj et al., 2018).

Les deux consortiums ont complètement réduit le Cr(VI) contenu dans les effluents de tanneries après 3 jours de traitement. Par conséquent, les effluents bioremédiés par les deux consortiums bactériens sont conformes à la norme marocaine de rejet (2 mg/L). Cette élimination du Cr(VI) pourrait s'expliquer par sa bioréduction et/ou sa bioaccumulation par les bactéries (Kang et al., 2007). Des résultats comparables ont montré l'efficacité des souches bactériennes dans la détoxification du Cr(VI) des effluents de tanneries (Gupta et al., 2018). Egalement, trois souches bactériennes isolées des effluents de tanneries identifiées comme *Bacillus* sp., *Enterobactera erogenes* et *Bacillus pumilus*, ont montré une forte capacité d'élimination du chrome hexavalent d'environ 97% (Elkarrach et al., 2020b).

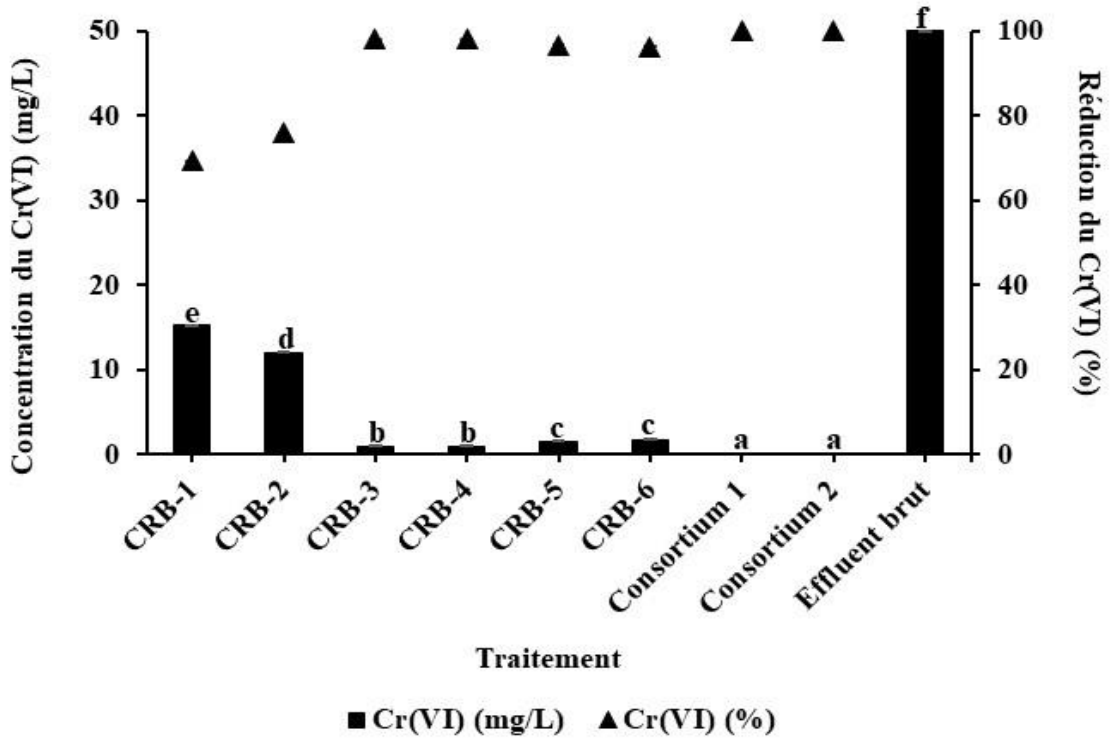


Figure 35 : Réduction du Cr(VI) d'effluent de tanneries après traitement avec les souches bactériennes (5 jours) et les consortiums (3 jours). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

2.7. Analyse statistique multivariée

- **Premièrement** :

Les coefficients de corrélation ont été calculés sur les valeurs moyennes des données des paramètres physico-chimiques de l'effluent brut et traité par les souches bactériennes séparées et en consortiums (**Tableau 25**). Des corrélations étroites et significatives ont été trouvées entre tous les paramètres étudiés. En effet, des relations positives ont été détectées entre NO_3^-, SO_4^{2-}, NTK, COD et Cr(VI), alors que tous ces paramètres étaient négativement liés au pH. Pour la réduction du Cr(VI), les associations les plus fortes ont été notées avec le nitrate ($r = 0{,}993^{***}$) et le sulfate ($r = 0{,}961^{***}$).

Tableau 25 : Corrélations entre les analyses physico-chimiques des effluents de tanneries brut et traité.

Variables	pH	NO_3-	SO_4^{2}-	NTK	DCO	Cr(VI)
pH	-	-0,918***	-0,940***	-0,910***	-0,905***	-0,918***
NO_3-			0,954***	0,898***	0,925***	0,993***
SO_4^{2}-				0,933***	0,863**	0,961***
NTK					0,896***	0,867**
COD						0,888**
Cr(VI)						

* Significatif au niveau de probabilité de 0,05, ** Significatif au niveau de probabilité de 0,01, *** Significatif au niveau de probabilité de 0,001.

- **Deuxièmement** :

L'**a**nalyse en **c**omposantes **p**rincipales (**ACP**) a été appliquée sur la matrice de corrélation basée sur les valeurs moyennes des données afin de trouver des similitudes entre les facteurs étudiés et les différentes variables (**Figure 36**). Les résultats ont montré que 96,03% de la variabilité totale observée était expliquée par les deux premières **c**omposantes **p**rincipales (**PC**) ; la majeure partie de la variation a été capturée par PC1 (93,18%), tandis que PC2 représentait 2,85%. PC1 sépare clairement l'effluent brut dans le sens positif et l'effluent traité par les six souches et les consortiums bactériens dans le sens opposé. Les valeurs de tous les paramètres (Cr(VI), NO_3^-, SO_4^{2-}, NTK et DCO) étaient plus élevées dans l'effluent non traité à l'exception des valeurs de pH, où, il y avait une nette séparation de Cr(VI), NO_3^-, SO_4^{2-}, NTK et DCO vers la direction positive de PC1 interagissant négativement avec le pH de l'autre côté de cet axe. La variabilité le long de PC2 était principalement due au NTK et DCO qui étaient positionnés vers le bas et aux Cr(VI), NO_3^- et SO_4^{2-} observé vers le haut. L'ACP a également montré une association entre la réduction du Cr(VI) avec celle des ions nitrates et sulfates, puisqu'ils sont représentés dans le même quadrillion de l'ACP.

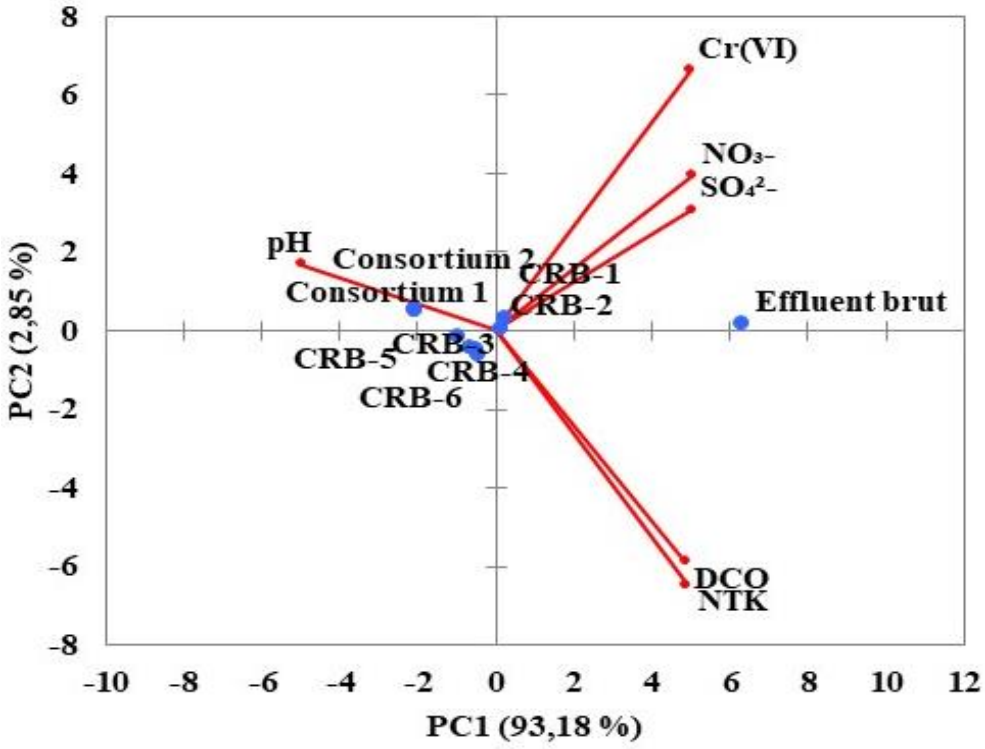


Figure 36 : Projections de l'analyse en composantes principales (ACP) sur les axes 1 et 2 représentant 97,44% de la variance totale. Les valeurs propres de la matrice de corrélation sont symbolisées par des vecteurs représentant les paramètres qui influencent le plus chaque axe, **pH** : potentiel d'hydrogène, **NO_3^-** : nitrate, **SO_4^{2-}** : sulfate, **NTK** : azote Kjeldhal, **DCO** : demande chimique en oxygène, **Cr(VI)** : chrome hexavalent.

- **<u>Troisièmement</u>** :

Pour expliquer la relation entre la réduction du Cr(VI) et l'élimination des autres paramètres de pollution des effluents de tanneries, une régression linéaire a été tracée sur la base des valeurs moyennes des données des paramètres physico-chimiques des effluents (brut et traité) (**Figure 37**). La régression a également montré une corrélation significative entre la réduction du Cr(VI) et l'élimination des ions de nitrates et de sulfates, puisque le R^2 le plus élevé est enregistré entre ces paramètres, de l'ordre de 0,985 et 0,995, respectivement.

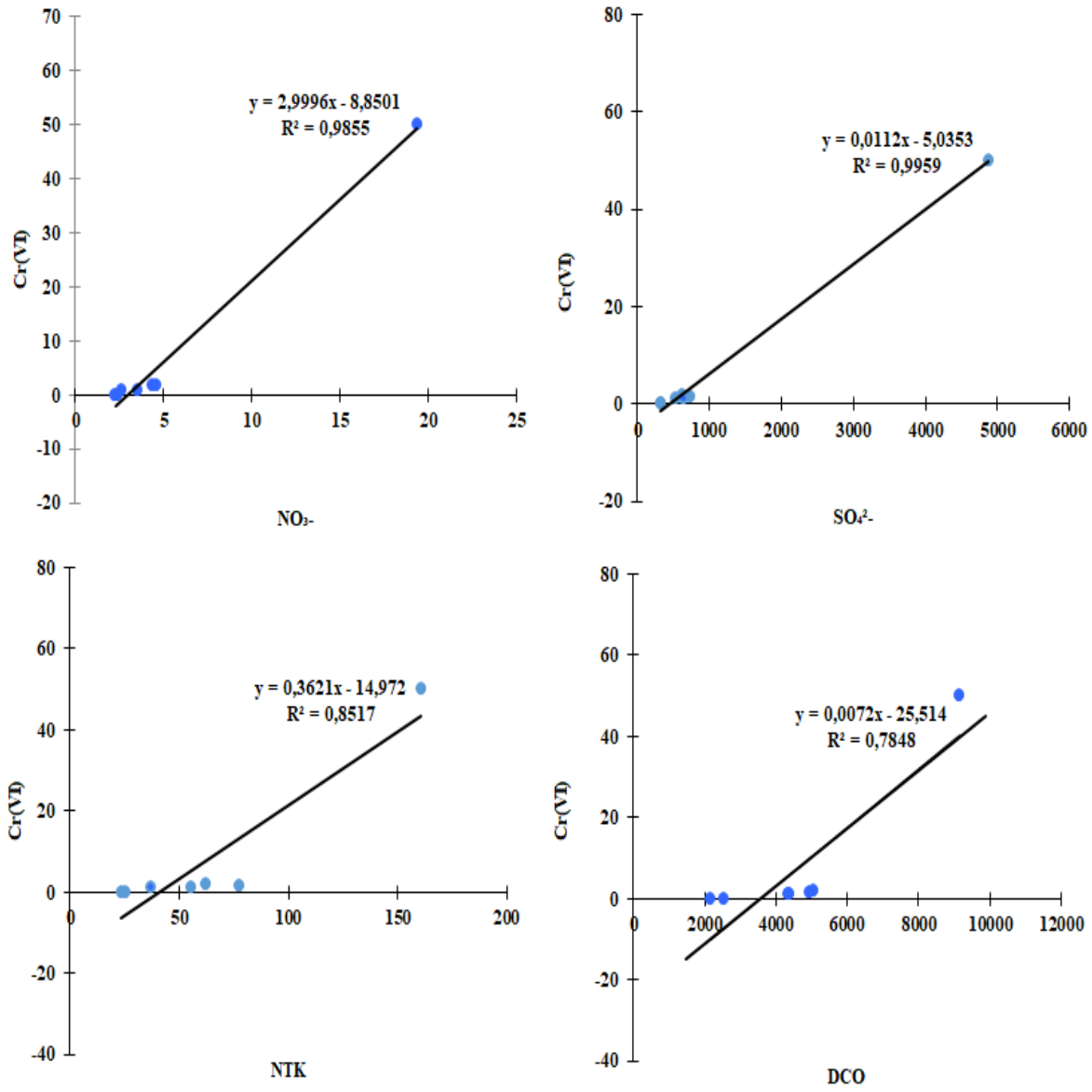


Figure 37 : Régression linéaire du Cr(VI) avec les autres paramètres de pollution de l'effluent des tanneries brut et traité.

Ces résultats, ainsi que ceux de l'ACP et des études de corrélation, indiquent la présence d'une relation étroite et forte entre la détoxification bactérienne du Cr(VI), du NO_3^- et du SO_4^{2-} dans les effluents de tanneries. Cette constatation confirme que la présence de ces éléments n'affecte pas la capacité de nos cellules à réduire le Cr(VI). Au contraire, les souches bactériennes démontrent une remarquable capacité à éliminer tous ces éléments de manière efficace. La capacité des traitements biologiques des effluents de tanneries, à l'aide de bactéries, à réduire simultanément la pollution par le chrome et d'autres polluants organiques et inorganiques a été signalée par d'autres chercheurs (Tadesse et al., 2016 ; Alemu et al., 2019).

VI. Contribution à la valorisation de l'effluent bioremédié par irrigation

Lorsque les effluents de tanneries non traités ; contenant des niveaux élevés de polluants organiques et minéraux ; sont rejetés dans l'eau, dans le sol ou utilisés pour des pratiques d'irrigation, ils provoquent des niveaux élevés de pollution. Dans le cas de leurs utilisations dans l'irrigation, la pollution élevée par les métaux et les composés organiques est la cause de la diminution de la fertilité des sols. En effet, les eaux usées de tanneries affectent négativement les caractéristiques chimiques et biologiques du sol, sa forte teneur en sulfate, sel et métaux conduit à la carence de certains micronutriments essentiels dans le sol, tels que le Zn, le Cu et le Fe (Alvarez Bernal et al., 2006 ; Raj et al., 2014). D'où l'obligation de traiter ces effluents avant leur rejet dans les plans d'eau ou leur utilisation en irrigation.

Dans la présente étude, les objectifs de la bioremédiation des effluents de tanneries traités par les souches bactériennes réductrices du Cr(VI) sont :

i. L'encouragement à la mise en place d'une station de traitement biologique des effluents industriels.
ii. La valorisation des effluents industriels traités par irrigation des plantes de tomates.

Faut signaler, qu'avant d'irriguer les plants de tomates, les souches bactériennes ont été testées pour leur capacité à induire ou non une hypersensibilité chez les plantes de tabac.

1. Test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac

Les six souches bactériennes ont été testées pour leur capacité à induire une réponse d'hypersensibilité (RH) sur les feuilles de tabac. Heureusement, toutes les souches étudiées sont incapables de provoquer une RH dans les feuilles de tabac après 5 jours d'inoculation (**Tableau 26**) en comparaison avec les souches phytopathogènes utilisées lors de cette expérience : *Agrobacterium tumefaciens* et *Allorhizobium vitis*.

Tableau 26 : Résultat de test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac.

Test	**Témoin**	***A. tumefaciens***	***A. vitis***	**CRB-1**	**CRB-2**	**CRB-3**	**CRB-4**	**CRB-5**	**CRB-6**
Observation	-	+	+	-	-	-	-	-	-

+ : présence de HR, - : Absence de HR

La **figure 38** illustre la réaction d'hypersensibilité induite par les souches phytopathogènes par rapport au témoin (eau potable) et à nos souches bactériennes. Il a été démontré que plusieurs bactéries phytopathogènes qui provoquent une nécrose sur la plante hôte se sont avérées capables d'induire une RH dans d'autres plantes (Alfano and Collmer, 1996). La capacité de ces souches à induire une RH est due à leur pouvoir de produire des enzymes, en particulier la polygalacturonase (PG) (Rodriguez-Palenzuela et al., 1991). Ainsi, selon ces résultats, nos souches bactériennes peuvent être utilisées en toute sécurité dans les processus d'irrigation des plantes.



Figure 38 : Test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac. (**a**) : témoin, (**b**) : *A. tumefaciens*, (**c**) : *A. vitis* et (**d**) : *S. gallinarum*.

2. Irrigation des plantes de tomates

L'efficacité du traitement des effluents de tanneries par nos souches bactériennes séparées et en consortium a été évaluée par un test de phytotoxicité sur des plantes de tomates irriguées avec de l'eau du robinet, l'effluent traité et l'effluent brut. Après 40 jours d'irrigation, différents paramètres de croissance, physiologiques et biochimiques des plantes de tomates ont été mesurés.

2.1. Traits de croissance

L'effet des effluents bruts, dépollués et de l'eau potable sur les paramètres de croissance à savoir : les longueurs des parties aériennes et racinaires et les poids de matière fraîche et sèche des plantes de tomates sont présentés dans le **tableau 27**.

Tableau 27 : Influence des effluents de tanneries traités, bruts et l'eau potable sur la croissance des plantes de tomates. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

	Long PA (cm)	Long PR (cm)	Poids MF (g)	Poids MS (g)
Témoin	32,66 ± 0,57^{b}	20,33 ± 1,15^{a}	15,11 ± 0,93^{bcd}	1,86 ± 0,13^{bc}
Effluent brut	35,33 ± 0,57^{a}	15,33 ± 0,57^{e}	13,91 ± 0,73^{d}	1,64 ± 0,11^{c}
CRB-1	28,33 ± 2,17^{cd}	16,66 ± 1,57^{cde}	16,36 ± 0,91^{abc}	1,84 ± 0,11^{bc}
CRB-2	27,33 ± 2,08^{d}	16 ± 1^{de}	16,05 ± 0,90^{abcd}	2,14 ± 0,13^{ab}
CRB-3	28,66 ± 0,57^{cd}	16,66 ± 2,31^{cde}	15,73 ± 2,80^{bcd}	1,89 ± 0,12^{bc}
CRB-4	27 ± 2,64^{d}	16 ± 1^{de}	14,27 ± 1,83^{cd}	1,85 ± 0,13^{bc}
CRB-5	29,33 ± 2,51^{d}	18 ± 1^{bcd}	16,12 ± 0,82^{abcd}	2,19 ± 0,13^{ab}
CRB-6	29,33 ±0,57^{d}	17,33 ± 1,5^{bcd}	14,02 ± 2,56^{cd}	1,87 ± 0,13^{bc}
Consortium 1	31,33 ± 2,60^{b}	18,33 ± 1,57^{abc}	18,35 ± 1,07^{a}	2,28 ± 0,15^{a}
Consortium 2	30,33 ± 0,57^{bc}	19,33 ± 1,57^{ab}	17,04 ± 0,44^{ab}	2,14 ± 0,11^{ab}

En général, la longueur des plantes arrosées avec des effluents traités par les bactéries était comparable à celle du témoin. Les valeurs des longueurs des parties aériennes (Long PA) des plantes de tomates se sont avérées plus élevées pour les plantes irriguées par les effluents non traités (35,33 cm) par rapport aux effluents dépollués (31,33 cm) et à l'eau du robinet (32,66 cm). En revanche, les longueurs des parties racinaires (Long PR) des plantes irriguées par les effluents bioremédiés et par l'eau potable sont plus élevées par rapport à celles des effluents non traités. D'autre part, les poids des matières fraîches et sèches (MF et MS) des plantes irriguées par des effluents non traités sont faibles par rapport aux eaux usées de tanneries traitées et à l'eau potable. De plus, une augmentation remarquable et maximale du poids frais et sec a été marquée pour les plantes irriguées par le consortium 1 ; 18,35 g et 2,28 g, respectivement.

Dans l'ensemble, les eaux usées de tanneries non traitées ont eu un effet négatif sur les paramètres de croissance des plantes de tomates (**Figure 39**). En accord avec nos résultats, des études phytotoxiques similaires ont été menées par des chercheurs pour vérifier l'effet de l'exposition des plantes aux effluents de tanneries non traité ou au stress du chrome (Singh and Sinha, 2005 ; Chandra et al., 2009 ; Joyia et al., 2021).

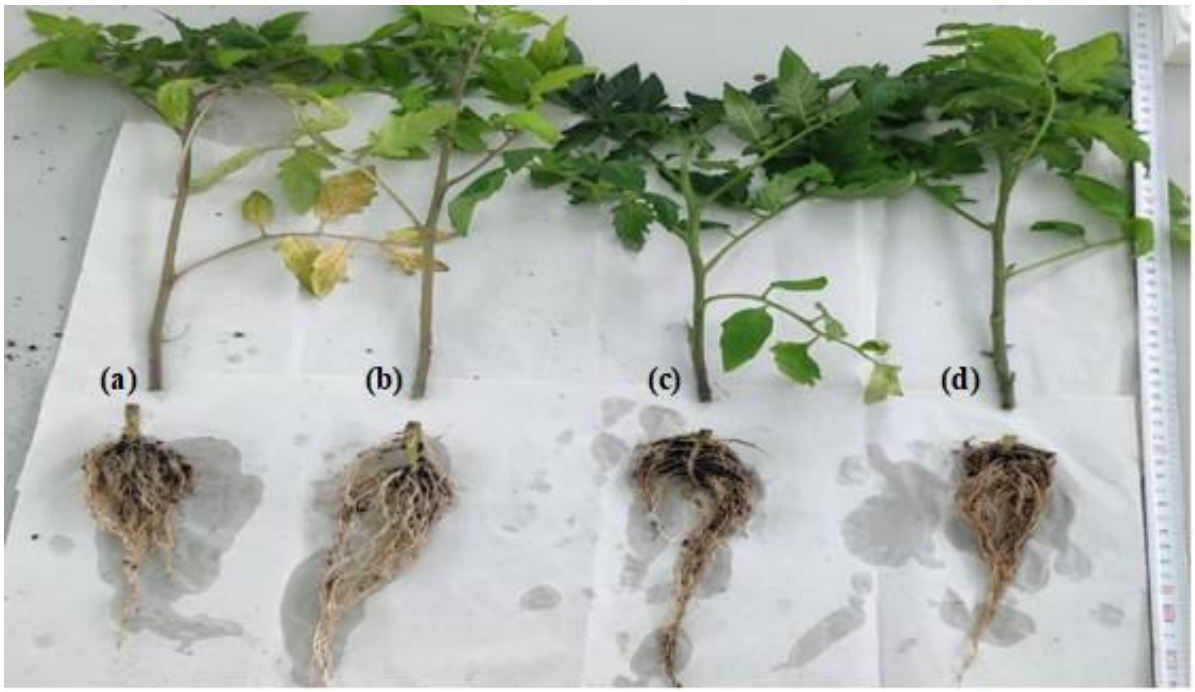


Figure 39 : Croissance des plantes de tomates irriguées par (**a**) l'effluent non traité, (**b**) l'eau potable, (**c**) l'effluent traité par le consortium 2 et (**d**) l'effluent traité par le consortium1.

Une réduction significative des paramètres de croissance chez plusieurs plantes, telles que *Arabidopsis thaliana* (Eleftheriou et al., 2015), *Lycopersicon esculentum* (Brasili et al., 2020) et *Sorghum bicolor* (Bruno et al., 2020) a été également notée. Une autre étude de Zereen et al. (2013) a montré que les poids frais et sec des pousses et des racines des cultivars de tournesol irrigués avec des effluents de tanneries non traités provoquaient une réduction sévère de la croissance. De même, des effets phytotoxiques des effluents de tanneries ont également été constatés sur le coton et l'aubergine. Les effluents de tanneries dilués à des concentrations de 0%, 10%, 20%, 30%, 40% et 50% ont montré une réduction significative des traits de croissance des racines et des pousses de ces plantes, en particulier aux concentrations les plus élevées (Joyia et al., 2021). En effet, la réduction des attributs de croissance en présence de contamination de métaux lourds a été associée à des changements ultra-structuraux tels que la lignification, pour arrêter le transfert de métaux toxiques à l'intérieur de la racine (Barros et al., 2015 ; Shahid et al., 2017). Les chercheurs ont également établi un lien entre la diminution de la croissance des racines et l'altération du métabolisme des cellules racinaires, l'augmentation de la perméabilité membranaire et la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (Eleftheriou et al., 2015 ; Liu et al., 2020).

2.2. Traits physiologiques

a. Mesure de la fluorescence de la chlorophylle (Fv/Fm) et de la teneur en pigments chlorophylliens

L'évaluation de la toxicité des effluents traités, non traités et de l'eau potable sur les plantes de tomates a été également déterminée en termes de traits physiologiques à savoir ; la fluorescence de la chlorophylle et la teneur en pigment chlorophylliens. Les résultats sont présentés dans le **tableau 28**.

Tableau 28 : Effet des effluents de tanneries traités, bruts et l'eau potable sur la fluorescence de la chlorophylle (Fv/Fm) et les pigments photosynthétiques (mg/g MF) dans les feuilles de tomates. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

	Fv/Fm	Chl-a	Chl-b	Chl total	Car+Xan	SPAD
Témoin	$0,781 \pm 0,02^{cd}$	$1,452 \pm 0,08^{b}$	$0,515 \pm 0,15^{ab}$	$2,1 \pm 0,07^{bc}$	$0,479 \pm 0,07^{ab}$	$34,9 \pm 1,86^{abc}$
Effluent brut	$0,713 \pm 0,02^{e}$	$0,817 \pm 0,09^{c}$	$0,241 \pm 0,04^{b}$	$1,073 \pm 0,01^{d}$	$0,224 \pm 0,04^{c}$	$24,9 \pm 1,6^{e}$
CRB-1	$0,79 \pm 0,01^{abcd}$	$1,98 \pm 0,17^{a}$	$0,588 \pm 0,25^{a}$	$2,604 \pm 0,11^{a}$	$0,564 \pm 0,12^{ab}$	$34,63 \pm 0,84^{abc}$
CRB-2	$0,75 \pm 0,02^{d}$	$1,478 \pm 0,12^{b}$	$0,341 \pm 0,19^{ab}$	$1,843 \pm 0,22^{c}$	$0,415 \pm 0,01^{b}$	$32,533 \pm 0,444^{bcd}$
CRB-3	$0,801 \pm 0,02^{abc}$	$1,928 \pm 0,13^{a}$	$0,483 \pm 0,18^{ab}$	$2,444 \pm 0,21^{ab}$	$0,503 \pm 0,04^{ab}$	$29,833 \pm 1,555^{d}$
CRB-4	$0,793 \pm 0,04^{bcd}$	$1,6 \pm 0,11^{b}$	$0,586 \pm 0,16^{a}$	$2,217 \pm 0,22^{bc}$	$0,484 \pm 0,14^{ab}$	$31,5 \pm 1,933^{cd}$
CRB-5	$0,773 \pm 0,03^{cd}$	$1,522 \pm 0,11^{b}$	$0,512 \pm 0,11^{ab}$	$2,063 \pm 0,07^{c}$	$0,506 \pm 0,08^{ab}$	$35,733 \pm 1,377^{ab}$
CRB-6	$0,801 \pm 0,02^{abc}$	$1,571 \pm 0,28^{b}$	$0,542 \pm 0,14^{ab}$	$2,144 \pm 0,43^{bc}$	$0,491 \pm 0,03^{ab}$	$32,833 \pm 1,88^{bc}$
Consortium 1	$0,816 \pm 0,01^{ab}$	$2,012 \pm 0,14^{a}$	$0,61 \pm 0,3^{a}$	$2,649 \pm 0,29^{a}$	$0,591 \pm 0,19^{a}$	$35,766 \pm 1,77^{ab}$
Consortium 2	$0,821 \pm 0,01^{a}$	$2,172 \pm 0,07^{a}$	$0,539 \pm 0,25^{ab}$	$2,748 \pm 0,19^{a}$	$0,619 \pm 0,08^{a}$	$38,266 \pm 2,75^{a}$

Fv/Fm : fluorescence chlorophyllienne, **Chl-a** : chlorophylle a, **Chl-b** : chlorophylle b, **Chl total** : chlorophylle totale, **Car+Xan** : caroténoïdes et xanthophylles.

Une augmentation significative de la fluorescence, de la teneur en Chl-a, b, de la chlorophylle totale, des caroténoïdes et de l'indice SPAD a été observée dans les feuilles des plantes de tomates irriguées avec les effluents traités par les deux consortiums bactériens par rapport à l'eau potable. Les plantes irriguées avec les effluents dépollués avec les six souches bactériennes séparément ont également montré des niveaux élevés de pigments photosynthétiques. Alors que la concentration de ces pigments était significativement affectée

dans les plantes irriguées par les effluents bruts. Cette augmentation de la teneur en chlorophylle des feuilles de tomates irriguées par des effluents bioremédiés, au moyen des bactéries, peut être due à la présence de micronutriments, à la réduction de la charge polluante (Gupta and Sinha, 2007 ; Bharagava et al., 2008), ainsi qu'à l'effet promoteur de certaines bactéries dans l'amélioration de la croissance des plantes, en particulier la souche *Brachybacterium paraconglomeratum* (CRB-1) qui a été rapportée comme PGPR dans d'autres études (Barnawal et al., 2016).

En effet, les teneurs en pigments chlorophylliens des plantes irriguées avec les effluents de tanneries non traités étaient très faibles par rapport à celles irriguées avec les traitées et l'eau du robinet, de plus les feuilles n'étaient pas beaucoup plus vertes et la sénescence a commencé plus tôt. Ces résultats peuvent être attribués à l'interférence des métaux dans la biosynthèse de la chlorophylle par inhibition directe des étapes enzymatiques (Öncel et al., 2000). Par ailleurs, la sénescence précoce des plantes traitées avec des effluents fortement pollués ainsi que la réduction d'autres paramètres végétatifs que celle des plantes homologues irriguées avec les effluents bioremédiés dans la présente étude sont fortement soutenues par Gilbert and Dubey (2003) et Zereen et al. (2013).

Plusieurs études antérieures ont prouvé que l'accumulation du chrome dans les plantes affecte leur processus métabolique de plusieurs façons, y compris la réduction de la croissance, la photosynthèse, la teneur en chlorophylle, l'inhibition de certaines activités enzymatiques et la dégradation des chloroplastes et des mitochondries (Van Assche and Clijsters, 1990 ; Trippi, 1990 ; Guilizzoni, 1991). Ces effets ont été décrits comme étant liés à des niveaux plus élevés de radicaux libres générés pendant la sénescence, en particulier dans des conditions stressantes (Dhindsa et al., 1981 ; Thompson et al., 1987).

2.3. Traits biochimiques

a. Teneur en sucres, protéines et proline

Comparé au témoin (eau potable), il est évident d'après les données de la **figure 40** que l'effluent non traité affecte largement les relations osmotiques des plantes de tomates. Les teneurs en sucres, protéines et proline dans les feuilles des plantes irriguées à l'eau du robinet et l'effluent traité par le consortium 1 étaient proches ; 13,42 mg/g (sucres), 5,96 mg/g (protéines), 0,35 mg/g (proline) et 9,91 mg/g (sucres), 5,23 mg/g (protéines) et 0,38 mg/g (proline) MF, respectivement pour l'eau du robinet et le consortium 1. Alors que dans

l'effluent non traité étaient très faibles, autour de 4,94 mg/g, 1,21 mg/g et 0,08 mg/g MF, respectivement pour les sucres, les protéines et la proline.

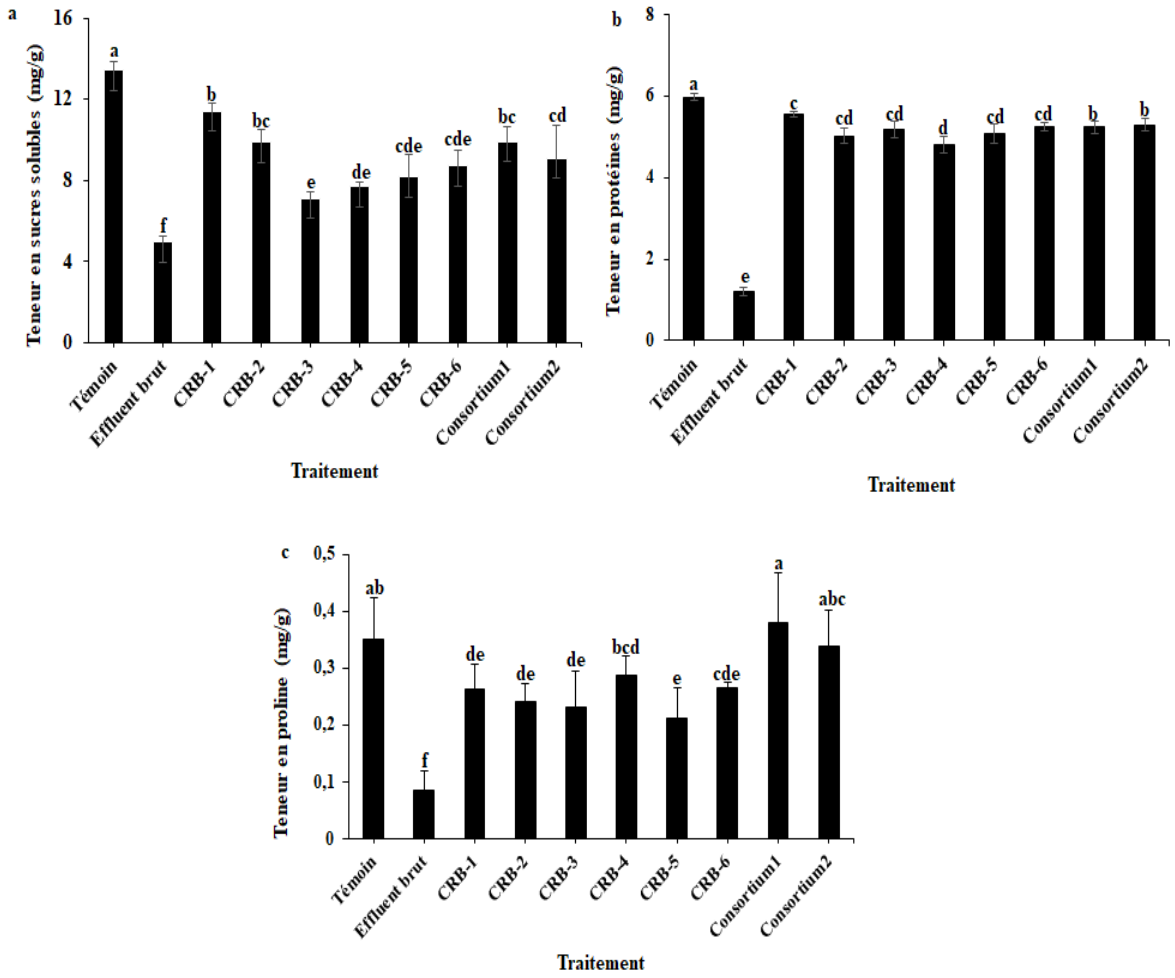


Figure 40 : Effet de différents traitements sur la teneur en (a) sucres solubles, (b) protéines et (c) proline (mg/g MF) des feuilles de plantes de tomates. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (à 5%, LSD-Fisher).

D'après ces résultats, il est clair que l'irrigation avec les effluents non traités rejetés par les industries de tannage du cuir extrêmement riches en chrome, diminues significativement les traits biochimiques des plantes et constituent une grave préoccupation environnementale lorsque ces effluents sont utilisés dans l'irrigation des champs (Lofrano et al., 2013). Des résultats similaires ont été obtenus par Chandra et al. (2009) et Joyia et al. (2021) dans des études sur les effets phytotoxiques de diverses concentrations des effluents de tanneries sur le blé, la moutarde, le coton et l'aubergine. Sangeetha et al. (2012) ont également signalé que l'utilisation d'effluents de tannerie bruts pour l'irrigation peut détériorer la qualité nutritionnelle des plantes. Néanmoins, les effluents traités améliorent le rendement des plantes

en raison de leurs concentrations raisonnables de composants métalliques et organiques et peuvent être bénéfiques s'ils sont présents dans des limites acceptables. De même, Zeeren et al. (2013) ont montré que des concentrations élevées d'effluents de tannerie (80 - 100%) induisent une sorte de stress sur les plantes, qui affecte divers processus métaboliques entraînant une réduction de la croissance végétative et plus tard reproductive de la plante. Des opinions similaires ont également été rapportées par d'autres chercheurs (Kilicel and Dag, 2006 ; Rusan et al., 2007). Cependant, des effluents dilués ou traités peuvent être utilisés pour l'irrigation des cultures. L'ensemble des conclusions tirées suggère que la croissance et le développement de la plante sont affectés à la fois par le niveau de pollution de l'effluent et les propriétés du sol et de la plante.

Les pertes importantes de croissance et de rendement dues aux effluents de tanneries sont un sujet de grave inquiétude d'un point de vue agricole. L'irrigation avec les eaux usées de la tannerie est censée réduire considérablement la croissance des plantes en raison des niveaux élevés de chrome dans les effluents (Amin et al., 2013). A des concentrations dépassant les limites, le chrome trivalent et hexavalent sont tous deux toxiques pour les plantes et génèrent un stress oxydatif, inhibent la germination, réduisent la croissance, diminuent la teneur en protéines, inhibent la photosynthèse et modifient les activités enzymatiques des plantes exposées (Shanker et al., 2004 ; Panda and Choudhury, 2005 ; Alemu et al., 2019).

2.4. Teneur en éléments métalliques

L'irrigation des plantes de tomates avec les effluents de tanneries non traités a conduit à l'accumulation de certains métaux et notamment du chrome dans les feuilles (**Tableau 29**). La concentration du chrome total dans les feuilles irriguées avec de l'eau potable et les effluents traités par le consortium 1 est de 0,016 µg/g et 0,035 µg/g MS, respectivement, tandis que celles irriguées avec l'effluent brut sont de l'ordre de 0,072 µg/g MS. L'irrigation par l'effluent pollué a également augmenté l'accumulation d'ions Na^+ dans les feuilles de tomate.

En revanche, les concentrations de K et de Ca dans les feuilles irriguées par l'eau potable et l'effluent traité sont plus élevées que dans celles irriguées par l'effluent brut. Selon la FAO/WHO (2011), la concentration maximale admissible de Cr était de 0,1 mg/Kg, pour les légumes à feuilles, donc les tomates irriguées avec des effluents bioremédiés soit par des souches séparées, soit par des consortiums ne dépassent pas la norme.

Tableau 29 : Accumulation comparative des métaux (µg/g MS) dans les feuilles des plantes de tomates irriguées avec les effluents traités, bruts et l'eau potable.

	Cr	Zn	Fe	K	Ca	Na
Témoin	0,016	0,092	0,775	158,1	16,383	89,906
Effluent brut	0,072	0,087	0,623	60,76	12,812	255,26
CRB-1	0,034	0,011	0,66	110,56	16,596	137,32
CRB-2	0,019	0,082	0,407	134,58	17,541	113,36
CRB-3	0,06	0,098	0,342	154,73	23,043	108,40
CRB-4	0,02	0,083	0,358	72,02	10,829	75,687
CRB-5	0,016	0,164	0,287	57,38	24,062	143,43
CRB-6	0,057	0,082	0,236	195,74	16,786	72,786
Consortium 1	0,035	0,097	0,942	219,78	24,062	105,67
Consortium 2	0,037	0,086	0,624	118,29	16,86	79,26

Des résultats comparables ont été enregistrés par Joyia et al. (2021), où l'exposition des plantes de coton et d'aubergine aux effluents de tanneries a également augmenté progressivement l'accumulation tissulaire d'ions Cr et Na après l'application d'effluents à des concentrations de 30%, 40% et 50%. Une autre étude a montré que l'accumulation de chrome varie d'une plante à l'autre, dont les valeurs moyennes du chrome total (mg/Kg) dans la partie comestible des légumes utilisés étaient dans l'ordre suivant : tomate (0,197 ± 0,005) > carotte (0,122 ± 0,002) > chou (0,113 ± 0,004) > oignon (0,098 ± 0,002) > bette à carde (0,088 ± 0,001) > betterave (0,05 ± 0,001) (Alemu et al., 2019).

En effet, le processus d'absorption, d'accumulation et de distribution des métaux par les plantes est fortement influencé par les caractéristiques du sol telles que le pH, la capacité d'échange cationique, la teneur en matière organique, la concentration des métaux disponibles dans le sol et la capacité des plantes à absorber et accumuler les métaux lourds (Barman et al., 2000 ; Quartacci et al., 2006 ; Abbas et al., 2007).

2.5. Analyse statistique multivariée

Le **tableau 30** présente les coefficients de corrélation entre les caractères physiologiques, biochimiques et la concentration en chrome dans les feuilles des plants de tomate soumis aux différents traitements d'irrigation.

Tableau 30 : Corrélations entre les traits analysés dans les feuilles de plantes de tomates cultivées sous différents traitements.

Variables	Chl-a	Chl-b	Chl total	Car+Xan	Fv/Fm	TSS	Prot	Prol	Cr
Chl a	-	0,764**	0,982***	0,946***	0,905***	0,386	0,734*	0,713*	-0,550
Chl b			0,865***	0,884***	0,887***	0,485	0,768**	0,748*	-0,655*
Chl total				0,978***	0,945***	0,474	0,800**	0,782**	-0,621
Car+Xan					0,934***	0,523	0,839**	0,793**	-0,703*
Fv/Fm						0,369	0,758*	0,805**	-0,547
TSS							0,758*	0,712*	-0,692*
Prot								0,770**	-0,887***
Prol									-0,668*
Cr									

Chl-a : chlorophylle a, **Chl-b** : chlorophylle b, **Chl total** : chlorophylle totale, **Car+Xan** : caroténoïdes et xanthophylles, **Fv/Fm** : fluorescence chlorophyllienne, **TSS** : teneur en sucres solubles, **Prot** : protéines, **Prol** : proline, **Cr** : chrome.

* Significatif au niveau de probabilité de 0,05, ** Significatif au niveau de probabilité de 0,01, *** Significatif au niveau de probabilité de 0,001.

Des associations positives ont été observées entre tous les traits, à l'exception du chrome qui a montré une corrélation négative avec les paramètres analysés. Les corrélations les plus fortes ont été observées entre les paramètres physiologiques tels que Chl-a, Chl-b, chl totale, Car+Xan et Fv/Fm.

En ce qui concerne les traits biochimiques, la teneur en protéines a montré une corrélation significative avec la teneur en Chl-b, chl totale, Car+Xan, proline et chrome. De plus, la teneur en proline a été significativement corrélée avec la teneur en chl totale, Car+Xan, Fv/Fm et les protéines.

En plus des études de corrélation, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur les valeurs moyennes des différents traitements illustrés dans la **figure 41**.

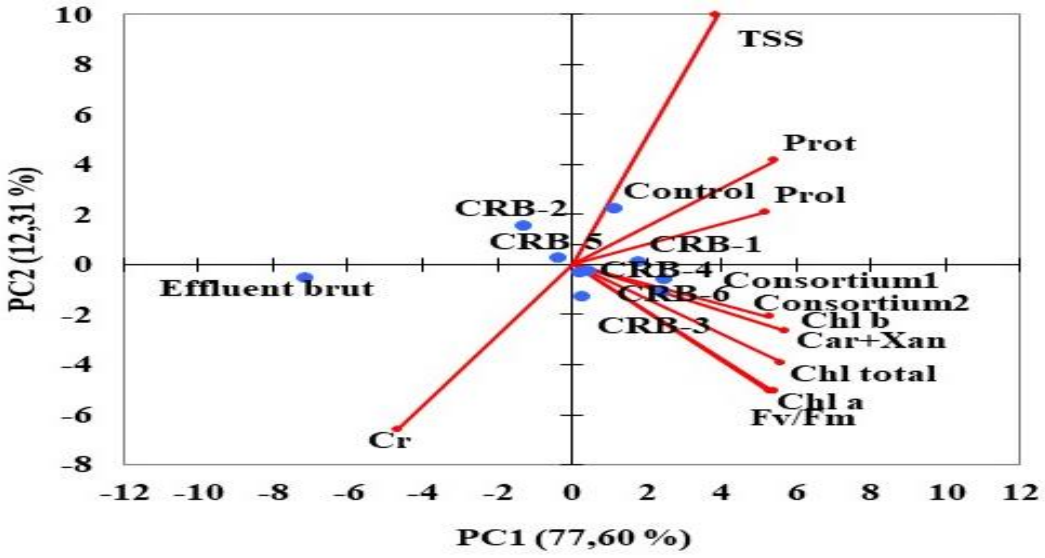


Figure 41 : Projections PCA sur les axes 1 et 2 représentant 89,91% de la variance totale. Les valeurs propres de la matrice de corrélation sont symbolisées par des vecteurs représentant les traits qui influencent le plus chaque axe. Les 10 points représentent les différents traitements appliqués. **Chl-a** : chlorophylle a, **Chl-b** : chlorophylle b, **Chl total** : chlorophylle totale, **Car+Xan** : caroténoïdes et xanthophylles, **Fv/Fm** : fluorescence chlorophyllienne, **TSS** : teneur en sucres solubles, **Prot** : protéines, **Prol** : proline, **Cr** : chrome.

Les deux premiers axes de l'analyse en composantes principales (ACP) ont représenté 89,91% de la variance totale, avec 77,60% pour l'axe 1 et 12,31% pour l'axe 2. L'axe 1 a clairement distingué les traits physiologiques et biochimiques du côté positif, tandis que la concentration de chrome était positionnée du côté opposé.

Une relation positive a été observée entre tous les traits physiologiques et biochimiques situés du côté positif de l'axe 1. Les traits biochimiques étaient regroupés principalement en haut de l'axe 2, tandis que les traits physiologiques étaient regroupés en bas de l'axe 2.

Les valeurs de tous les paramètres étaient plus élevées chez les plantes irriguées avec les effluents traités biologiquement et l'eau potable, à l'exception du chrome qui présentait des concentrations plus élevées chez les plantes irriguées avec les effluents bruts.

En conclusion, les eaux usées de tanneries brutes se sont révélées toxiques et ont entraîné des perturbations significatives dans tous les traits mesurés. La croissance des plantes de tomates, y compris la couleur, la longueur et le poids, a été clairement affectée par les effluents de

tannerie non traités. De plus, les autres caractéristiques mesurées, telles que les caractéristiques physiologiques, biochimiques et la teneur en métaux, en particulier le chrome, ont confirmé l'impact négatif des effluents pollués sur les plantes.

Cependant, grâce à la bioremédiation des effluents à l'aide de nos consortiums bactériens, l'effet toxique des effluents sur les plantes a été réduit, voire amélioré leur croissance.

Conclusion et perspectives

L'objectif global de ce travail était de sélectionner des bactéries résistantes aux métaux lourds (CRB), en particulier au Cr(VI), capables de réduire la toxicité de ce métal dans les effluents pollués pour leur réutilisation dans l'irrigation des plantes sans avoir un effet négatif sur la croissance des végétaux.

L'isolement des bactéries a été réalisé à partir de biotopes extrêmes, les sols de mines abandonnées de la région de Taza au Maroc. Les analyses physico-chimiques ont montré la pollution métallique de ces environnements, notamment en fer, plomb, cuivre, chrome et zinc ce qui présente un excellent choix pour l'isolement des bactéries multi-résistantes aux métaux lourds. À partir de ces sites, 201 isolats bactériens ont été isolés et évalués pour leur capacité à tolérer le Cr(VI). Six CRB ont montré une multi-résistance, reflétée par des CMI élevées au Cr(VI) et aux autres métaux testés (Pb, Cu, Co, Zn, Cd, Hg, Ni et Fe) sur milieu LB agar. La résistance des isolats au Cr(VI) et aux métaux a ensuite été déterminée dans le milieu LB liquide et les isolats présentaient des CMI *vis-à-vis* au Cr(VI) de l'ordre de 700, 600, 700, 800, 800 et 700, respectivement pour CRB-1, CRB-2, CRB-3, CRB-4, CRB-5 et CRB-6.

Tous les isolats étaient Gram positifs et en plus de leur résistance aux métaux, ils ont la capacité de produire de l'acide indole-3-acétique (AIA), de l'acide cyanidrique (HCN), des exopolysaccharides EPS, une solubilisation du phosphate tricalcique et une résistance à la salinité à des degrés divers. Concernant la résistance aux ATB, les six isolats sont plus ou moins résistants aux ATB testés (érythromycine, gentamicine, chloramphénicol, augmentin et kanamycine) confirmant que la résistance aux antibiotiques est corrélée à la résistance aux métaux.

Le potentiel antagoniste *in-vitro* entre les isolats bactériens a montré que ces isolats peuvent être utilisés dans deux consortiums bactériens selon le degré d'activité antagoniste, le **consortium 1** est composé de CRB-1+CRB-3+CRB-4 et le **consortium 2** de CRB-2+CRB-5 +CRB-6. Les isolats ont été identifiés comme *Brachybacterium paraconglomeratum* ER41 (CRB-1), *Staphylococcus aureus* CC1956 (CRB-2), *Bacillus safensis* strain CCMM B29 (CRB-3), *Bacillus pumilus* strain ATCC 7061 (CRB-4), *Staphylococcus succinus* subsp. *Succinus* strain AMG-D1 (CRB-5) et *Staphylococcus gallinarum* strain VIII1 (CRB-6).

Les paramètres environnementaux affectant la réduction du Cr(VI) ont été optimisés, ce qui est crucial pour la conception précise du processus de bioremédiation. Les six CRB pouvaient efficacement croître et réduire le Cr(VI) dans diverses conditions, y compris le pH (5 - 9), la température (25 à 45°C) et les concentrations de Cr(VI) (50 à 300 mg/L). L'optimisation des conditions de culture a assuré une réduction complète de 100 mg/L du Cr(VI) en 48 h par CRB-1, CRB-2, CRB-3, CRB-4 et CRB-5 et en 96 h pour CRB-6 dans des conditions optimisées de pH (7 - 9) et de température (30°C - 35°C). De plus, la présence du cuivre favorise la réduction du Cr(VI), alors que la présence de certains métaux comme le Cd et l'Hg l'inhibe. Les oxyanions coexistants (nitrate, sulfate, carbonate et calcium) ont un effet minimal sur la bioréduction du Cr(VI). Les donneurs d'électrons, en particulier le glucose et le glycérol, stimulent la réduction bactérienne du Cr(VI). De plus, les résultats ont confirmé le rôle majeur des protéines et du métabolisme cellulaire dans la détoxification du Cr(VI) par les six souches bactériennes.

Le processus d'élimination du Cr(VI) par les cellules libres peut être limité, du fait de la perte d'activité et de la forte toxicité qui risque de tuer les cellules. En revanche, la technique d'immobilisation présente une stratégie alternative pour réduire la pollution au Cr(VI). Les résultats de l'immobilisation des cellules dans des billes d'alginate ont montré une efficacité élevée de réduction du Cr(VI), en particulier pour les souches CRB-4, CRB-5 et CRB-6, tandis que les cellules libres et les souches immobilisées CRB-1, CRB-2 et CRB-3 ont montré le même taux de réduction. De plus, les cellules immobilisées sont douées d'un pouvoir remarquable pour réduire les contaminations répétées par le Cr(VI) dans un milieu non renouvelé sans apport de nutriments. Compte tenu de ces propriétés remarquables de stabilité, de réduction élevée du Cr(VI) et de facilité de réutilisation, les biobilles d'alginate offrent un grand potentiel pour leur application dans l'assainissement du terrain contaminé au Cr(VI).

Simultanément, le mécanisme lié à l'élimination du Cr(VI) par les six souches bactériennes a été étudié. La modélisation des isothermes d'adsorption a révélé que le modèle de Langmuir décrit d'une manière satisfaisante le présent processus d'adsorption indiquant que la biosorption du Cr(VI) se produit sur une surface homogène et qu'il y a une énergie égale pour tous les sites et une fois que ces sites sont complètement saturés, aucune autre adsorption ne peut prend place. Une caractérisation plus poussée par des analyses MEB-EDX a indiqué que le mécanisme d'élimination du Cr(VI) par les souches étudiées se faisait principalement par bioréduction précédée par adsorption de ce métal. Sur la base du IRTF, les groupes fonctionnels hydroxyle, carboxyle et phosphoryle à la surface des cellules ont principalement participé à la biosorption et à la bioréduction du Cr(VI) et même à la combinaison avec le

Cr(III) produit. Ces résultats prouvent que le processus d'élimination du Cr(VI) par les six bactéries est précédé de son adsorption suivie de sa réduction intracellulaire ou membranaire et précipitation du Cr(III).

Les essais de réduction du Cr(VI) avec les cellules au repos, les cellules perméabilisées et les fractions subcellulaires ont suggéré que la réduction du Cr(VI) par les six bactéries étudiées est à médiation enzymatique et se produit principalement dans le cytoplasme pour CRB-4, CRB-5 et CRB-6, tandis que la réduction par CRB-1, CRB-2 et CRB-3 était associée à la fraction membranaire et exprimée de manière constitutive dans toutes les souches. Plus important encore, une protéine d'un poids moléculaire compris entre 30 et 35 kDa a été détectée dans le profil SDS-PAGE des cellules de CRB-2, CRB-3, CRB-4 et CRB-5 et de 30 kDa dans CRB-6 après contact avec le Cr(VI), la présente protéine peut être la chromate réductase.

Sur la base des résultats obtenus, les six souches bactériennes sélectionnées sont performantes pour l'application dans la biorestauration des effluents industriels pollués par des métaux lourds. Le choix des effluents de tanneries est justifié par les grands volumes d'eau utilisés dans cette industrie et donc les énormes rejets chargées de chrome et d'autres polluants organiques et inorganiques rejetés dans l'environnement sans traitement préalable. La caractérisation physico-chimique des eaux usées de tanneries de la zone industrielle d'Ain Nokbi à Fès au Maroc a indiqué qu'elle présente des paramètres de pollution très élevés au-delà des limites autorisées et qu'il ne convient pas au rejet dans le milieu récepteur et nécessite donc un suivi et une évaluation réguliers avant rejet. Cependant, son traitement adéquat est un besoin urgent pour la protection de l'environnement. Le traitement des effluents de l'activité de tannage par un procédé biologique apparaît difficile, car il est fortement chargé en métaux lourds et présente un environnement toxique pour la biomasse microbienne. Cette étude a prouvé l'efficacité de la bioremédiation par les bactéries, où la pollution en azote, sulfate, DCO et Cr(VI) diminuait significativement après traitement avec les six souches bactériennes et surtout avec les consortiums bactériens.

L'efficacité du traitement des effluents de tanneries par nos souches bactériennes a été évaluée par des tests de phytotoxicité sur les plantes de tomates. Les plantes qui ont été irriguées avec les effluents de tanneries traités avec les souches bactériennes ont montré des traits de croissance, physiologiques et biochimiques proches de celles irriguées avec de l'eau potable et même certains caractères, notamment de croissance et physiologiques, étaient plus importants chez les plantes irriguées par les effluents traités avec les consortiums bactériens, montrent la capacité de nos souches à améliorer la croissance des plantes. Cependant, les plantes irriguées

par les effluents bruts étaient de couleur jaune et les paramètres mesurés étaient inférieurs par rapport au témoin.

Compte tenu des excellentes performances de réduction du Cr(VI) par les six bactéries étudiées (*Brachybacterium paraconglomeratum* ER41, *Staphylococcus aureus* CC1956, *Bacillus safensis* strain CCMM B29, *Bacillus pumilus* strain ATCC 7061, *Staphylococcus succinus* subsp. *Succinus* strain AMG-D1 et *Staphylococcus gallinarum* strain VIII1), ce travail peut apporter une référence précieuse pour la bioremédiation des eaux usées contaminées au chromate.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette thèse ouvre de grandes portes sur l'avenir du traitement biologique par les bactéries. Il serait intéressant comme perspective d'approfondir et d'exploiter le présent travail :

- Identification des gènes impliqués dans la résistance et la réduction du Cr(VI).
- Visualisation de la morphologie cellulaire après contact avec le Cr(VI) par microscopie électronique à transmission (MET) pour une meilleure localisation subcellulaire du Cr(VI).
- Identification des produits finaux de réduction du Cr(VI) par analyse par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS).
- Recherche d'autres caractères favorisant la croissance des plantes chez les souches bactériennes.
- Bioremédiation des autres effluents industriels et sols pollués par les métaux lourds.
- Suivi des effets phytotoxiques des effluents bioremédiés et bruts jusqu'au stade fruit des plantes.
- Application de consortiums bactériens à l'échelle industrielle et environnementale pour le traitement des effluents industriels pollués par les métaux lourds.

Références bibliographiques

A

Abbas, S. T., Sarfraz, M., Mehdi, S. M., & Hassan, G. (2007). Trace elements accumulation in soil and rice plants irrigated with the contaminated water. Soil and Tillage Research, 94(2), 503-509.

Abid, R. A. F. I. A., Mahmood, S., Ghaffar, S., Zahra, S., & Noreen, S. I. B. G. H. A. (2019). Tannery effluent induced morpho-biochemical expressions and chromium accumulation in *Jatropha curcas* L. and *Pongamia pinnata* L. Sains Malaysiana, 48(5), 927-936.

Aboulhassan, M. A., Souabi, S., Yaacoubi, A., Zaim, N., & Bouthir, F. Z (2008). Les effluents de tannerie caractérisation et impact sur le milieu marin Tannery effluents characterization and impacts on the marine environment. Review des Sciences de l'Eau, 21(4), 463-473.

Abouzaid, N., & Duchesne, M. (1984). Direction contrôle qualité des eaux. (Manuel de prélèvement et d'analyse des eaux), ONEP.

Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Keyhan, M., Blake, R., & Matin, A. (2004). Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. Environmental Microbiology, 6(8), 851-860.

Adelekan, B. A., & Abegunde, K. D. (2011). Heavy metals contamination of soil and groundwater at automobile mechanic villages in Ibadan, Nigeria. International journal of physical sciences, 6(5), 1045-1058.

ADEME, (l'Agence De l'Environnement de la Maîtrise de l'Energie). (2006). Traitement biologique des sols pollués : recherche et innovation, Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par l'ADIT - Société Nationale d'Intelligence Stratégique, Coordination technique : Frédérique CADIERE - Département Sites et Sols Pollués – Direction Déchets et Sols - ADEME (Angers).

Adhikari, T., Manna, M. C., Singh, M. V., & Wanjari, R. H. (2004). Bioremediation measure to minimize heavy metals accumulation in soils and crops irrigated with city effluent. Journal of Food Agriculture and Environment, 2, 266-270.

AFNOR. (1988). Détermination du pH dans l'eau. NF X 31–103. Détermination du pH dans l'eau. Paris pp. 11. AFNOR éditions, NF X31-103: French standard NF X31-103 of November 1988.

AFNOR. (1977). Détermination de la résistivité ou de la conductivité électrique French standard: NF T 90-031. NF T 90-031 of December 1977.

Afzal, M., Shabir, G., Iqbal, S., Mustafa, T., Khan, Q. M., & Khalid, Z. M. (2014). Assessment of heavy metal contamination in soil and groundwater at leather industrial area of Kasur, Pakistan. CLEAN–Soil, Air, Water, 42(8), 1133-1139.

Aissam, H. (2003). Etude de la biodégradation des effluents des huileries (Margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase.

Al-Weher, S. M. (2008). Levels of heavy metal Cd, Cu and Zn in three fish species collected from the Northern Jordan Valley, Jordan. Jordan journal of biological sciences, 1(1), 41-46.

Alam, M. Z., & Malik, A. (2008). Chromate resistance, transport and bioreduction by *Exiguobacterium* sp. ZM-2 isolated from agricultural soil irrigated with tannery effluent. Journal of basic microbiology, 48(5), 416-420.

Alemu, T., Mekonnen, A., & Leta, S. (2019). Integrated tannery wastewater treatment for effluent reuse for irrigation: Encouraging water efficiency and sustainable development in developing countries. Journal of Water Process Engineering, 30, 100514.

Alfano, J. R., & Collmer, A. (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. The Plant Cell, 8(10), 1683.

Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. Chemosphere, 91(7), 869-881.

Allouche, F. N., Hellal, A., & Laraba, A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de *lactobacilles thermophiles* utilisées dans l'industrie laitière. Nature & Technology, (3), 13.

Almeida, J. C., Cardoso, C. E., Tavares, D. S., Freitas, R., Trindade, T., Vale, C., & Pereira, E. (2019). Chromium removal from contaminated waters using nanomaterials–a review. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 118, 277-291.

Alsac, A. (2007). Analysis of heavy metals (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn et Hg) in soils by ICP-MS. Annales de Toxicologie Analytique, XIX(1), 37-41.

Alvarez, A. H., Moreno-Sánchez, R., & Cervantes, C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 181(23), 7398-7400.

Alvarez-Bernal, D., Contreras-Ramos, S. M., Trujillo-Tapia, N., Olalde-Portugal, V., Frías-Hernández, J. T., & Dendooven, L. (2006). Effects of tanneries wastewater on chemical and biological soil characteristics. Applied Soil Ecology, 33(3), 269-277.

Amin, H., Arain, B. A., Amin, F., & Surhio, M. A. (2013). Phytotoxicity of chromium on germination, growth and biochemical attributes of *Hibiscus esculentus* L. American Journal of Plant Sciences, 2013.

An, Z., Zhang, H., Wen, Q., Chen, Z., & Du, M. (2014). Desalination combined with hexavalent chromium reduction in a microbial desalination cell. Desalination, 354, 181-188.

An, Q., Deng, S., Xu, J., Nan, H., Li, Z., & Song, J. L. (2020). Simultaneous reduction of nitrate and Cr(VI) by *Pseudomonas aeruginosa* strain G12 in wastewater. Ecotoxicology and Environmental Safety, 191, 110001.

Anand, U., Ray, S., Ghosh, S., Banerjee, R., & Mukherjee, S. (2015). Structural aspects of a protein–surfactant assembly: native and reduced states of human serum albumin. The Protein Journal, 34(2), 147-157.

Anderson, D. M., Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. Estuaries, 25(4), 704-726.

Appenroth, K. J., Bischoff, M., Gabryś, H., Stoeckel, J., Swartz, H. M., Walczak, T., & Winnefeld, K. (2000). Kinetics of chromium (V) formation and reduction in fronds of the duckweed *Spirodela polyrhiza*—a low frequency EPR study. Journal of Inorganic Biochemistry, 78(3), 235-242.

Arivalagan, P., Singaraj, D., Haridass, V., & Kaliannan, T. (2014). Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. Ecological Engineering, 71, 728-735.

Arshad, M., Javaid, A., Manzoor, M., Hina, K., Ali, M. A., & Ahmed, I. (2019). Isolation and identification of chromium-tolerant bacterial strains and their potential to promote plant growth. In E3S web of conferences (Vol. 96, p. 01005). EDP Sciences.

Arslan, P., Beltrame, M., & Tomasi, A. (1987). Intracellular chromium reduction. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 931(1), 10-15.

Asha, L. P., & Sandeep, R. S. (2013). Review on bioremediation-potential tool for removing environmental pollution. International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences, 3(3), 21-33.

Ashraf, S., Naveed, M., Afzal, M., Ashraf, S., Rehman, K., Hussain, A., & Zahir, Z. A. (2018). Bioremediation of tannery effluent by Cr-and salt-tolerant bacterial strains. Environmental monitoring and assessment, 190(12), 1-11.

ATSDR, S. (2012). Toxicological profile for chromium. Agency for toxic substances and disease registry. Public Health Service, US Department of Health and Human Services. http://www. atsdr. cdc. gov/toxprofiles/tp. asp.

Augustynowicz, J., Grosicki, M., Hanus-Fajerska, E., Lekka, M., Waloszek, A., & Kołoczek, H. (2010). Chromium (VI) bioremediation by aquatic macrophyte *Callitriche cophocarpa* Sendtn. Chemosphere, 79(11), 1077-1083.

B

Badar, U., Ahmed, N., Beswick, A. J., Pattanapipitpaisal, P., & Macaskie, L. E. (2000). Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. Biotechnology letters, 22(10), 829-836.

Bahafid, W., Sayel, H., Joutey, N. T., & Ghachtouli, N. E. (2011). Removal mechanism of hexavalent chromium by a novel strain of *Pichia anomala* isolated from industrial effluents of Fez (Morocco). Journal of Environmental Science and Engineering, 5(8).

Bahafid, W., Joutey, N. T., Sayel, H., Iraqui-Houssaini, M., & El Ghachtouli, N. (2013a). Chromium adsorption by three yeast strains isolated from sediments in Morocco. Geomicrobiology Journal, 30(5), 422-429.

Bahafid, W., Joutey, N. T., Sayel, H., & Ghachtouli, N. E. (2013b). Mechanism of hexavalent chromium detoxification using *Cyberlindnera fabianii* yeast isolated from contaminated site in Fez (Morocco). Journal of Materials and Environmental Science, 4(6), 840-847.

Bai, J., Wu, X., Fan, F., Tian, W., Yin, X., Zhao, L., & Guo, J. (2012). Biosorption of uranium by magnetically modified *Rhodotorula glutinis*. Enzyme and microbial technology, 51(6-7), 382-387.

Baize, D. (2000). Teneurs totales en « métaux lourds » dans les sols français: résultats généraux du programme ASPITET. Le Courrier de l'Environnement de l'INRA, (40), 39-54.

Baize, D. (2009). Éléments traces dans les sols. Fonds géochimiques, fonds pédogéochimiques naturels et teneurs agricoles habituelles: définitions et utilités. Le Courrier de l'environnement de l'INRA, 57(57), 63-72.

Bala, M., Shehu, R. A., Lawal, M. (2008). Determination of the level of some heavy metals in water collected from two pollution prone irrigation areas around Kano metropolis, Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 1, 1, 36-38

Baldiris, R., Acosta-Tapia, N., Montes, A., Hernández, J., & Vivas-Reyes, R. (2018). Reduction of hexavalent chromium and detection of chromate reductase (ChrR) in *Stenotrophomonas maltophilia*. Molecules, 23(2), 406.

Ballerini, D., Gatellier, C., & Vogel, T. (1998). Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. Angers, Francia, 18-157.

Banerjee, S., Misra, A., Chaudhury, S., & Dam, B. (2019). A *Bacillus* strain TCL isolated from Jharia coalmine with remarkable stress responses, chromium reduction capability and bioremediation potential. Journal of hazardous materials, 367, 215-223.

Barman, S. C., Sahu, R. K., Bhargava, S. K., & Chaterjee, C. (2000). Distribution of heavy metals in wheat, mustard, and weed grown in field irrigated with industrial effluents. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 64(4), 489-496.

Barnawal, D., Bharti, N., Tripathi, A., Pandey, S. S., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2016). ACC-deaminase-producing endophyte *Brachybacterium paraconglomeratum* strain SMR20 ameliorates Chlorophytum salinity stress *via* altering phytohormone generation. Journal of plant growth regulation, 35(2), 553-564.

Barnhart, J. (1997). Occurrences, uses, and properties of chromium. Regulatory toxicology and pharmacology, 26(1), S3-S7.

Barrera-Díaz, C. E., Lugo-Lugo, V., & Bilyeu, B. (2012). A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction. Journal of hazardous materials, 223, 1-12.

Barros, J., Serk, H., Granlund, I., & Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. Annals of botany, 115(7), 1053-1074.

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil, 39(1), 205-207.

Batool, R., & Hasnain, S. (2012). Hexavalent chromium reduction by bacteria from tannery effluent. Journal of microbiology and biotechnology, 22(4), 547-554.

Batool, F., Akbar, J., Iqbal, S., Noreen, S., & Bukhari, S. N. A. (2018). Study of isothermal, kinetic, and thermodynamic parameters for adsorption of cadmium: an overview of linear and nonlinear approach and error analysis. Bioinorganic chemistry and applications, 2018.

Battini, F., Cristani, C., Giovannetti, M., & Agnolucci, M. (2016). Multifunctionality and diversity of culturable bacterial communities strictly associated with spores of the plant beneficial symbiont *Rhizophagus intraradices*. Microbiological Research, 183, 68-79.

Bauvais, C. (2015). Diversité chimique et bactéries associées à *Spongia officinalis*, une éponge marine accumulatrice de métaux (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).

Becker, D. S., Long, E. R., Proctor, D. M., & Ginn, T. C. (2006). Evaluation of potential toxicity and bioavailability of chromium in sediments associated with chromite ore processing residue. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 25(10), 2576-2583.

Behera, S. S., Sourav, D., Parhi, P. K., Tripathy, S. K., Mohapatra, R. K., & Mayadhar, D. (2017). Kinetics, thermodynamics and isotherm studies on adsorption of methyl orange from aqueous solution using ion exchange resin Amberlite IRA-400. Desalination and Water Treatment, 60, 249-260.

Ben Abou, M. B., & El Haji, M. (2014). Treatments by electrocoagulation-filtration of uncontrolled Leachate discharge from the city of Taza and re-use in the germination of sorghum and alfalfa International. Journal of Innovation and Applied Studies ISSN, 2028-9324.

Bennouna, A. (2020). Gestion de l'eau au Maroc et changement climatique. Espace Géographique et Société Marocaine, (32).

Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. Journal of bacteriology, 186(3), 595-600.

Bharagava, R. N., Chandra, R., & Rai, V. (2008). Phytoextraction of trace elements and physiological changes in Indian mustard plants (*Brassica nigra* L.) grown in post methanated distillery effluent (PMDE) irrigated soil. Bioresource Technology, 99(17), 8316-8324.

Bharagava, R. N., Saxena, G., Mulla, S. I., & Patel, D. K. (2018). Characterization and identification of recalcitrant organic pollutants (ROPs) in tannery wastewater and its phytotoxicity evaluation for environmental safety. Archives of environmental contamination and toxicology, 75(2), 259-272.

Bhardwaj, V., Kumar, P., & Singhal, G. (2014). Toxicity of heavy metals pollutants in textile mills effluents. International Journal of Scientific and Engineering Research, 5(7), 2229-5518.

Bhardwaj, R., Gupta, A., & Garg, J. K. (2018). Impact of heavy metals on inhibitory concentration of *Escherichia coli*—a case study of river Yamuna system, Delhi, India. Environmental monitoring and assessment, 190(11), 1-17.

Bielicka, A., Bojanowska, I., & Wisniewski, A. (2005). Two Faces of Chromium-Pollutant and Bioelement. Polish Journal of environmental studies, 14(1).

Bilgili, M. S., Varank, G., Sekman, E., Top, S., & Özçimen, D. (2012). Modeling 4-chlorophenol removal from aqueous solutions by granular activated carbon. Environmental Modeling & Assessment, 17(3), 289-300.

Billon, G., Ouddane, B., Recourt, P., & Boughriet, A. (2002). Depth variability and some geochemical characteristics of Fe, Mn, Ca, Mg, Sr, S, P, Cd and Zn in anoxic sediments from Authie Bay (northern France). Estuarine, Coastal and Shelf Science, 55(2), 167-181.

Biswas, J., Bose, P., Mandal, S., & Paul, A. K. (2018). Reduction of hexavalent chromium by a moderately halophilic bacterium, *Halomonas smyrnensis* KS802 under saline environment. Environmental Sustainability, 1(4), 411-423.

Bose, S., & Bhattacharyya, A. K. (2008). Heavy metal accumulation in wheat plant grown in soil amended with industrial sludge. Chemosphere, 70(7), 1264-1272.

Bragato, C., Brix, H., & Malagoli, M. (2006). Accumulation of nutrients and heavy metals in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel and *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla in a constructed wetland of the Venice lagoon watershed. Environmental Pollution, 144(3), 967-975.

Branco, R., Chung, A. P., Verissimo, A., and Morais, P. V. (2005). Impact of chromium-contaminated wastewaters on the microbial community of a river. FEMS Microbiology Ecology 54(1), 35-46.

Branco, R., Chung, A. P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P., & Zhitkovich, A. (2008). The chromate-inducible chrBACF operon from the transposable element Tn OtChr confers resistance to chromium (VI) and superoxide. Journal of bacteriology, 190(21), 6996-7003.

Brasili, E., Bavasso, I., Petruccelli, V., Vilardi, G., Valletta, A., Dal Bosco, C., ... & Di Palma, L. (2020). Remediation of hexavalent chromium contaminated water through zero-valent iron nanoparticles and effects on tomato plant growth performance. Scientific reports, 10(1), 1-11.

Brezovšek, P., Eleršek, T., & Filipič, M. (2014). Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. Water Research, 52, 168-177.

Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. Heliyon, 6(9), e04691.

Brodie, E. L., Joyner, D. C., Faybishenko, B., Conrad, M. E., Rios-Velazquez, C., Malave, J., & Hazen, T. C. (2011). Microbial community response to addition of polylactate compounds to stimulate hexavalent chromium reduction in groundwater. Chemosphere, 85(4), 660-665.

Brown, S. D., Thompson, M. R., VerBerkmoes, N. C., Chourey, K., Shah, M., Zhou, J., & Thompson, D. K. (2006). Molecular Dynamics of the *Shewanella oneidensis* Response to Chromate Stress* S. Molecular & Cellular Proteomics, 5(6), 1054-1071.

Bruno, L. B., Karthik, C., Ma, Y., Kadirvelu, K., Freitas, H., & Rajkumar, M. (2020). Amelioration of chromium and heat stresses in Sorghum bicolor by Cr^{6+} reducing-thermotolerant plant growth promoting bacteria. Chemosphere, 244, 125521.

Bueno, B. Y. M., Torem, M. L., Molina, F. A. L. M. S., & De Mesquita, L. M. S. (2008). Biosorption of lead (II), chromium (III) and copper (II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies. Minerals engineering, 21(1), 65-75.

Bulgariu, L., Lupea, M., Bulgariu, D., Rusu, C., & Macoveanu, M. (2013). Equilibrium study of Pb (II) and Cd (II) biosorption from aqueous solution on marine green algae biomass. Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ), 12(1).

C

Camargo, F. A. O., Okeke, B. C., Bento, F. M., & Frankenberger, W. T. (2003). In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29 stimulated by Cu^{2+}. Applied microbiology and biotechnology, 62(5), 569-573.

Campos, J., Martinez-Pacheco, M., & Cervantes, C. (1995). Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain. Antonie van Leeuwenhoek, 68(3), 203-208.

Campos, V. L., Moraga, R., Yánez, J., Zaror, C. A., & Mondaca, M. A. (2005). Chromate reduction by *Serratia marcescens* isolated from tannery effluent. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 75(2), 400-406.

Cárdenas-González, J. F., & Acosta-Rodríguez, I. (2010). Hexavalent chromium removal by a *Paecilomyces* sp. fungal strain isolated from environment. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2010.

Carol, D., Kingsley, S. J., & Vincent, S. (2012). Hexavalent chromium removal from aqueous solutions by *Pleurotus ostreatus* spent biomass. International Journal of Engineering Science and Technology, 4(1).

Celebi, M., Yurderi, M., Bulut, A., Kaya, M., & Zahmakiran, M. (2016). *Palladium nanoparticles* supported on amine-functionalized SiO_2 for the catalytic hexavalent chromium reduction. Applied Catalysis B: Environmental, 180, 53-64.

Cervantes, C., & Silver, S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. Plasmid, 27(1), 65-71.

Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS microbiology reviews, 25(3), 335-347.

Cetin, D., Dönmez, S., & Dönmez, G. (2008). The treatment of textile wastewater including chromium (VI) and reactive dye by sulfate-reducing bacterial enrichment. Journal of environmental management, 88(1), 76-82.

Chai, L., Ding, C., Tang, C., Yang, W., Yang, Z., Wang, Y., & Li, J. (2018). Discerning three novel chromate reduce and transport genes of highly efficient *Pannonibacter phragmitetus* BB: from genome to gene and protein. Ecotoxicology and Environmental Safety, 162, 139-146.

Chandra, R., Kumar, K., & Singh, J. (2004a). Impact of anaerobically treated and untreated (raw) distillery effluent irrigation on soil microflora, growth, total chlorophyll and protein contents of *Phaseolus aureus* L. Journal of Environmental Biology, 25(4), 381-385.

Chandra, R., Pandey, P. K., & Srivastava, A. (2004b). Comparative toxicological evaluation of untreated and treated tannery effluent with *Nostoc muscorum* L. (algal assay) and microtox bioassay. Environmental monitoring and assessment, 95(1), 287-294.

Chandra, R., Yadav, S., & Mohan, D. (2008). Effect of distillery sludge on seed germination and growth parameters of green gram (*Phaseolus mungo* L.). Journal of Hazardous Materials, 152(1), 431-439.

Chandra, R., Bharagava, R. N., Yadav, S., & Mohan, D. (2009). Accumulation and distribution of toxic metals in wheat (*Triticum aestivum* L.) and Indian mustard (*Brassica campestris* L.) irrigated with distillery and tannery effluents. Journal of hazardous materials, 162(2-3), 1514-1521.

Chandra, R., Bharagava, R. N., Kapley, A., & Purohit, H. J. (2011). Bacterial diversity, organic pollutants and their metabolites in two aeration lagoons of common effluent

treatment plant (CETP) during the degradation and detoxification of tannery wastewater. Bioresource technology, 102(3), 2333-2341.

Chardin, B., Dolla, A., Chaspoul, F., Fardeau, M., Gallice, P., & Bruschi, M. (2002). Bioremediation of chromate: thermodynamic analysis of the effects of Cr(VI) on sulfate-reducing bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(3), 352-360.

Chatterjee, S., Chatterjee, N. C., & Dutta, S. (2012). Bioreduction of chromium (VI) to chromium (III) by a novel yeast strain Rhodotorula mucilaginosa (MTCC 9315). African Journal of Biotechnology, 11(83), 14920-14929.

Chen, G., Fan, J., Liu, R., Zeng, G., Chen, A., & Zou, Z. (2012a). Removal of Cd(II), Cu(II) and Zn(II) from aqueous solutions by live *Phanerochaete chrysosporium*. Environmental technology, 33(23), 2653-2659.

Chen, Z., Huang, Z., Cheng, Y., Pan, D., Pan, X., Yu, M., & Wu, Z. (2012b). Cr(VI) uptake mechanism of *Bacillus cereus*. Chemosphere, 87(3), 211-216.

Chen, Z., Song, S., & Wen, Y. (2016). Reduction of Cr(VI) into Cr(III) by organelles of *Chlorella vulgaris* in aqueous solution: an organelle-level attempt. Science of the Total Environment, 572, 361-368.

Cheng, Y., Yan, F., Huang, F., Chu, W., Pan, D., Chen, Z., & Wu, Z. (2010). Bioremediation of Cr(VI) and immobilization as Cr(III) by *Ochrobactrum anthropi*. Environmental science & technology, 44(16), 6357-6363.

Chenniappan, C., Narayanasamy, M., Daniel, G. M., Ramaraj, G. B., Ponnusamy, P., Sekar, J., & Ramalingam, P. V. (2019). Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. Biological Control, 129, 55-64.

Cheung, K. H., Lai, H. Y., & Gu, J. D. (2006). Membrane-associated hexavalent chromium reductase of *Bacillus megaterium* TKW3 with induced expression. Journal of Microbiology and Biotechnology, 16(6), 855-862.

Cheung, K. H., & Gu, J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. International Biodeterioration & Biodegradation, 59(1), 8-15.

Cherchali, A., Boukhelata, N., Kaci, Y., Abrous-Belbachir, O., & Djebbar, R. (2019). Isolation and identification of a phosphate-solubilizing *Paenibacillus polymyxa* strain GOL 0202 from durum wheat (*Triticum durum* Desf.) rhizosphere and its effect on some seedlings morphophysiological parameters. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 19, 101087.

Cheung, K. H., & Gu, J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. International Biodeterioration & Biodegradation, 59(1), 8-15.

Chiboub, M., Saadani, O., Fatnassi, I. C., Abdelkrim, S., Abid, G., Jebara, M., & Jebara, S. H. (2016). Characterization of efficient plant-growth-promoting bacteria isolated from Sulla coronaria resistant to cadmium and to other heavy metals. Comptes rendus biologies, 339(9-10), 391-398.

Chirwa, E. M. N. (2005). Uncoupling Cr(VI) reduction in a dual species bacterial culture system electron flow pathway analysis. Chemical Engineering Transactions, 7, 14-18.

Cho-Ruk, K., Kurukote, J., Supprung, P., & Vetayasuporn, S. (2006). Perennial plants in the phytoremediation of lead-contaminated soils. Biotechnology, 5(1), 1-4.

Choppala, G., Kunhikrishnan, A., Seshadri, B., Park, J. H., Bush, R., & Bolan, N. (2018). Comparative sorption of chromium species as influenced by pH, surface charge and organic matter content in contaminated soils. Journal of Geochemical Exploration, 184, 255-260.

Corguinha, A. P. B., de Souza, G. A., Gonçalves, V. C., de Andrade Carvalho, C., de Lima, W. E. A., Martins, F. A. D., & Guilherme, L. R. G. (2015). Assessing arsenic, cadmium, and lead contents in major crops in Brazil for food safety purposes. Journal of food composition and analysis, 37, 143-150.

Chovanec, P., Sparacino-Watkins, C., Zhang, N., Basu, P., & Stolz, J. F. (2012). Microbial reduction of chromate in the presence of nitrate by three nitrate respiring organisms. Frontiers in Microbiology, 3, 416.

Cruz-Vega, D., Cervantes-González, E., Ammons, D., Rojas-Avelizapa, L. I., García-Mena, J., Pless, R. C., & Rojasavelizapa, N. G. (2008). Tolerance and removal of metals by microorganisms isolated from a pitch lake. Haz Waste Manage, B1.

Cummings, D. E., Fendorf, S., Singh, N., Sani, R. K., Peyton, B. M., & Magnuson, T. S. (2007). Reduction of Cr(VI) under acidic conditions by the facultative Fe(III)-reducing bacterium *Acidiphilium cryptum*. Environmental science & technology, 41(1), 146-152.

D

Dada, A. O., Olalekan, A. P., Olatunya, A. M., & Dada, O. J. I. J. C. (2012). Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn^{2+} unto phosphoric acid modified rice husk. IOSR Journal of applied chemistry, 3(1), 38-45.

Daneshvar, E., Vazirzadeh, A., & Bhatnagar, A. (2019). Biosorption of methylene blue dye onto three different marine macroalgae: Effects of different parameters on isotherm, kinetic and thermodynamic. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 43(6), 2743-2754.

Das, P., & Mishra, S. (2009). Hexavalent chromium [Cr(VI)]: yellow water pollution and its remediation. Sarovar Saurabh ENVIS Newsl Wetl Ecosyst, 5(2), 1-8.

Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., & Thatoi, H. (2014). Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. Chemosphere, 96, 112-121.

Davies Jr, F. T., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egilla, J. N., & Grossi, J. A. S. (2001). Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). Journal of Plant Physiology, 158(6), 777-786.

Dayan, A. D., & Paine, A. J. (2001). Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. Human & experimental toxicology, 20(9), 439-451.

De Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D., & Zanacchi, P. (1990). Genotoxicity of chromium compounds. A review. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 238(2), 99-172.

Dell'Amico, E., Cavalca, L., & Andreoni, V. (2008). Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. Soil Biology and Biochemistry, 40(1), 74-84.

Deng, S., & Ting, Y. P. (2005). Polyethylenimine-modified fungal biomass as a high-capacity biosorbent for Cr(VI) anions: sorption capacity and uptake mechanisms. Environmental science & technology, 39(21), 8490-8496.

Deng, L., Wang, H., & Deng, N. (2006). Photoreduction of chromium (VI) in the presence of algae, *Chlorella vulgaris*. Journal of hazardous materials, 138(2), 288-292.

Deng, L., Zhang, Y., Qin, J., Wang, X., & Zhu, X. (2009). Biosorption of Cr(VI) from aqueous solutions by nonliving green algae *Cladophora albida*. Minerals Engineering, 22(4), 372-377.

Dermont, G., Bergeron, M., Richer-Laflèche, M., & Mercier, G. (2010). Remediation of metal-contaminated urban soil using flotation technique. Science of the Total Environment, 408(5), 1199-1211.

Derwich, E., Benaabidate, L., Zian, A., Sadki, O., & Belghity, D. (2010). Caractérisation physico-chimique des eaux de la nappe alluviale du haut Sebou en aval de sa confluence avec oued Fès. LARHYSS Journal P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2521-9782, (8).

Desai, C., Jain, K., & Madamwar, D. (2008a). Hexavalent chromate reductase activity in cytosolic fractions of *Pseudomonas* sp. G1DM21 isolated from Cr(VI) contaminated industrial landfill. Process Biochemistry, 43(7), 713-721.

Desai, C., Jain, K., & Madamwar, D. (2008b). Evaluation of in vitro Cr(VI) reduction potential in cytosolic extracts of three indigenous *Bacillus* sp. isolated from Cr(VI) polluted industrial landfill. Bioresource technology, 99(14), 6059-6069.

Desjardin, V. (2002). Réduction du chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

Dey, S., & Paul, A. K. (2012). Optimization of cultural conditions for growth associated chromate reduction by *Arthrobacter* sp. SUK 1201 isolated from chromite mine overburden. Journal of Hazardous Materials, 213, 200-206.

Dey, S., & Paul, A. K. (2016). Assessment of heavy metal tolerance and hexavalent chromium reducing potential of *Corynebacterium paurometabolum* SKPD 1204 isolated from chromite mine seepage. AIMS Bioengineering, 3(3), 337-351.

Dhal, B., Thatoi, H., Das, N., & Pandey, B. D. (2010). Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 85(11), 1471-1479.

Dhal, B., Thatoi, H. N., Das, N. N., & Pandey, B. D. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review. Journal of hazardous materials, 250, 272-291.

Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. A. M. E. L. A., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental botany, 32(1), 93-101.

Dhungana, T. P., & Yadav, P. N. (2009). Determination of chromium in tannery effluent and study of adsorption of Cr(VI) on saw dust and charcoal from sugarcane bagasses. Journal of Nepal Chemical Society, 23, 93-101.

Dixit, S., Yadav, A., Dwivedi, P. D., & Das, M. (2015). Toxic hazards of leather industry and technologies to combat threat: a review. Journal of Cleaner Production, 87, 39-49.

Djelloul, C. (2014). Expérimentation, modélisation et optimisation de l'adsorption des effluents textiles (Doctoral dissertation, Faculté des sciences et de la technologie UMKBiskra).

Doshi, H., Ray, A., & Kothari, I. L. (2007). Bioremediation potential of live and dead *Spirulina*: spectroscopic, kinetics and SEM studies. Biotechnology and Bioengineering, 96(6), 1051-1063.

Donati, E., Oliver, C., & Curutchet, G. (2003). Reduction of chromium (VI) by the indirect action of *Thiobacillus thioparus*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 20, 69-73.

Drancourt, M., Berger, P., & Raoult, D. (2004). Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. Journal of clinical microbiology, 42(5), 2197-2202.

Driscoll, C. T., Mason, R. P., Chan, H. M., Jacob, D. J., & Pirrone, N. (2013). Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. Environmental science & technology, 47(10), 4967-4983.

Duffus, J. H. (2009). ″Heavy metals″ a meaningless term? (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 74, 793–807.

E

Elangovan, R., Abhipsa, S., Rohit, B., Ligy, P., & Chandraraj, K. (2006). Reduction of Cr(VI) by a *Bacillus* sp. Biotechnology Letters, 28(4), 247-252.

Elkarrach, K., Merzouki, M., Laidi, O., Biyada, S., Omor, A., & Benlemlih, M. (2020a). Sequencing batch reactor: Inexpensive and efficient treatment for tannery effluents of fez city in Morocco. Desalin Water Treat, 202, 71-77.

Elkarrach, K., Merzouki, M., Biyada, S., & Benlemlih, M. (2020). Bioaugmentation process for the treatment of tannery effluents in Fez, Morocco: An eco-friendly treatment using novel chromate bacteria. Journal of Water Process Engineering, 38, 101589.

Elkarrach, K., Merzouki, M., Laidi, O., Omor, A., Biyada, S., & Benlemlih, M. (2021). Combination of chemical and biological processes for the treatment of tannery effluent of Fez city in Morocco. Desalination and Water Treatment. 2021a, 220, 109-115.

El Aafi, N. (2016). Potentialités de bioremédiation par l'utilisation des associations rhizobactéries métallo-résistantes/légumineuses: vers une nouvelle approche de rhizoremédiation des sols contaminés par les métaux.

EL Karkouri, A., Harboul, K., Arroud, H., & Hassouni, M. E. (2019). Hexavalent chromium removal from a tannery effluent by a bacterial consortium. Moroccan Journal of Chemistry, 7(4), 7-4.

El Khalfaouy, R., Elabed, A., Khallouk, K., El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., & Lahsini, A. (2017). Microfiltration process for tannery wastewater treatment from a leather industry in Fez-Morocco area. J Mat Environ Sci, 8, 2276-2281.

El Khalil, H., El Hamiani, O., Bitton, G., Ouazzani, N., & Boularbah, A. (2008). Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: monitoring metal content and toxicity of soil runoff and groundwater. Environmental monitoring and assessment, 136(1), 147-160.

El Mouhri, G., Merzouki, M., Belhassan, H., Miyah, Y., Amakdouf, H., Elmountassir, R., & Lahrichi, A. (2020). Continuous adsorption modeling and fixed bed column studies: adsorption of tannery wastewater pollutants using beach sand. Journal of Chemistry, 2020.

Eleftheriou, E. P., Adamakis, I. D. S., Panteris, E., & Fatsiou, M. (2015). Chromium-induced ultrastructural changes and oxidative stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. International journal of molecular sciences, 16(7), 15852-15871.

Ercoli, E., & Ertola, R. (1983). SCP production from olive black water. Biotechnology Letters, 5(7), 457-462.

Erice, G., Irigoyen, J. J., Sánchez-Díaz, M., Avice, J. C., & Ourry, A. (2007). Effect of drought, elevated CO_2 and temperature on accumulation of N and vegetative storage proteins (VSP) in taproot of nodulated alfalfa before and after cutting. Plant science, 172(5), 903-912.

Esmi, C. F. (2014). Etude d'un procédé de type « rejet zéro » appliqué aux effluents chargés en métaux lourds et radionucléides par couplage nanofiltration et électro-élution contrôlée (Doctoral dissertation, Université Montpellier 2).

F

Fan, Z., Zhao, Y., Zhai, W., Qiu, L., Li, H., & Hoffmann, M. R. (2016). Facet-dependent performance of BiOBr for photocatalytic reduction of Cr(VI). RSC advances, 6(3), 2028-2031.

FAO/WHO, (2011). Food Standards Program Codex committee on contaminants in foods, Food. 1–89 (CF/5 INF/1).

Farag, S., & Zaki, S. (2010). Identification of bacterial strains from tannery effluent and reduction of hexavalent chromium. Journal of Environmental Biology, 31(5), 877.

Farmer, A. (2002). Managing environmental pollution. New York, USA: Taylor and e-Library. Pp 3-18.

Farouq, R., & Yousef, N. S. (2015). Equilibrium and kinetics studies of adsorption of copper (II) ions on natural biosorbent. International Journal of Chemical Engineering and Applications, 6(5), 319-324

Favas, P. J., Pratas, J., Varun, M., D'Souza, R., & Paul, M. S. (2014). Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. Environmental risk assessment of soil contamination, 3, 485-516.

Fedorovych, D. V., Gonchar, M. V., Ksheminska, H. P., Prokopiv, T. M., Nechay, H. I., Kaszycki, P., & Sibirny, A. A. (2009). Mechanisms of chromate detoxification in yeasts. Mikrobiol Biotechnol, 3, 15-21.

Fergusson, J. E. (1990). The heavy elements: chemistry, environmental impact adn health effects\Jack E. Fergusson (No. 628.53 F4.).

Finkel, S. E., & Kolter, R. (1999). Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(7), 4023-4027.

Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. J. biol. Chem, 66(2), 375-400.

Fude, L., Harris, B., Urrutia, M. M., & Beveridge, T. J. (1994). Reduction of Cr(VI) by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB III). Applied and Environmental Microbiology, 60(5), 1525-1531.

Fujie, K., Tsuchida, T., Urano, K., & Ohtake, H. (1994). Development of a bioreactor system for the treatment of chromate wastewater using *Enterobacter cloacae* HO1. Water Science and Technology, 30(3), 235.

G

Ganesh, R., Balaji, G., & Ramanujam, R. A. (2006). Biodegradation of tannery wastewater using sequencing batch reactor-respirometric assessment. Bioresource Technology, 97(15), 1815-1821.

Ganguli, A., & Tripathi, A. K. (2001). Inducible periplasmic chromate reducing activity in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a leather tannery effluent. Journal of microbiology and biotechnology, 11(3), 355-361.

Garbisu, C., Alkorta, I., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1998). Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. Biodegradation, 9(2), 133-141.

Garbisu, C., & Alkorta, I. (2003). Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. ejmp & ep (European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection), 3(1), 58-66.

Ge, S., Ge, S., Zhou, M., & Dong, X. (2015). Bioremediation of hexavalent chromate using permeabilized *Brevibacterium* sp. and *Stenotrophomonas* sp. cells. Journal of environmental management, 157, 54-59.

Gibert, M., & Dubey, R. (2003). Biochemical studies using barley and oat grown in effluent treated fields. J. Agron, 2, 115-121.

Giles, C. H., MacEwan, T. H., Nakhwa, S. N., & Smith, D. (1960). 786. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. Journal of the Chemical Society (Resumed), 3973-3993.

Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. Biotechnology advances, 28(3), 367-374.

Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and environmental microbiology, 61(2), 793-796.

González, P. S., Ambrosio, L. F., Paisio, C. E., Talano, M. A., Medina, M. I., & Agostini, E. (2014). Chromium (VI) remediation by a native strain: effect of environmental conditions and removal mechanisms involved. Environmental Science and Pollution Research, 21(23), 13551-13559.

Gopalakrishnan, A., Krishnan, R., Thangavel, S., Venugopal, G., & Kim, S. J. (2015). Removal of heavy metal ions from pharma-effluents using graphene-oxide nanosorbents and study of their adsorption kinetics. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 30, 14-19.

Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., Eaton, A. D. (1992). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 18th ed (Washington DC: Publication Office American Public Health Association). Pp. 451-454.

Gueye, M. (2016). Caractérisation par infrarouge à transformée de Fourier des réactions chimiques entre post-décharges et précurseurs organosiliciés: cas du 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

Guilizzoni, P. (1991). The role of heavy metals and toxic amterials in the physiological ecology of submersed macrophytes. Aquatic Botany, 41(1-3), 87-109.

Güllüce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., ... & Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. Food chemistry, 103(4), 1449-1456.

Gupta, A. K., & Sinha, S. (2007). Phytoextraction capacity of the plants growing on tannery sludge dumping sites. Bioresource technology, 98(9), 1788-1794.

Gupta, V. K., & Rastogi, A. (2009). Biosorption of hexavalent chromium by raw and acid-treated green alga *Oedogonium hatei* from aqueous solutions. Journal of Hazardous Materials, 163(1), 396-402.

Gupta, P., Rani, R., Chandra, A., & Kumar, V. (2018). Potential applications of *Pseudomonas* sp. (strain CPSB21) to ameliorate Cr^{6+} stress and phytoremediation of tannery effluent contaminated agricultural soils. Scientific reports, 8(1), 1-10.

Gupta, P., Rani, R., Chandra, A., Varjani, S., & Kumar, V. (2019). The role of microbes in chromium bioremediation of tannery effluent. In Water and Wastewater Treatment Technologies (pp. 369-377). Springer, Singapore.

Gupta, N., Yadav, K. K., Kumar, V., Krishnan, S., Kumar, S., Nejad, Z. D., & Alam, J. (2021). Evaluating heavy metals contamination in soil and vegetables in the region of North India: Levels, transfer and potential human health risk analysis. Environmental toxicology and pharmacology, 82, 103563.

Guria, M. K., Guha, A. K., & Bhattacharyya, M. (2014). A green chemical approach for biotransformation of Cr(VI) to Cr(III), utilizing *Fusarium* sp. MMT1 and consequent structural alteration of cell morphology. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2(1), 424-433.

H

Habbadi, K., Benbrahim, B., Benbouazza, A., & Benkirane, R. (2017). Rapid and sensitive methods for detection of *Allorhizobium vitis*, causal agent of grapevine crown gall. International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology, 2(4), 238857.

Hairuddin, M. N., Mubarak, N. M., Khalid, M., Abdullah, E. C., Walvekar, R., & Karri, R. R. (2019). Magnetic palm kernel biochar potential route for phenol removal from wastewater. Environmental Science and Pollution Research, 26(34), 35183-35197.

Hamdaoui, O., & Naffrechoux, E. (2007). Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon: Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters. Journal of hazardous materials, 147(1-2), 381-394.

Han, X., Wong, Y. S., Wong, M. H., & Tam, N. F. Y. (2007). Biosorption and bioreduction of Cr(VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. Journal of hazardous materials, 146(1-2), 65-72.

Harboul, K., El Yamani, M., Hammani, K., & El-Karkouri, A. (2022). Study of potential capacity for Cr(VI) reduction by *Staphylococcus gallinarum* strain VIII1 immobilized, resting and permeabilized. International Journal of Environmental Studies, 1-18.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., & Boudabous, A. J. B. T. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. Bioresource technology, 64(1), 7-15.

Haydar, S., & Aziz, J. A. (2009). Characterization and treatability studies of tannery wastewater using chemically enhanced primary treatment (CEPT)—a case study of Saddiq Leather Works. Journal of Hazardous Materials, 163(2-3), 1076-1083.

Hayzoun, H. (2014). Caractérisation et quantification de la charge polluante anthropique et industrielle dans le bassin du Sebou (Doctoral dissertation, Université de Toulon; Université Sidi Mohamed ben Abdellah (Fès, Maroc). Faculté des Sciences et Techniques).

He, M., Li, X., Liu, H., Miller, S. J., Wang, G., & Rensing, C. (2011). Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. Journal of hazardous materials, 185(2-3), 682-688.

He, X., Hou, B., Li, C., Zhu, Q., Jiang, Y., & Wu, L. (2014). Electrochemical mechanism of trivalent chromium reduction in 1-butyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid. Electrochimica Acta, 130, 245-252.

He, D., Zheng, M., Ma, T., Li, C., & Ni, J. (2015). Interaction of Cr(VI) reduction and denitrification by strain *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 under aerobic conditions. Bioresource technology, 185, 346-352.

Heitzer, A., & Sayler, G. S. (1993). Monitoring the efficacy of bioremediation. Trends in biotechnology, 11(8), 334-343.

Hemambika, B., & Kannan, V. R. (2012). Intrinsic characteristics of Cr^{6+}-resistant bacteria isolated from an electroplating industry polluted soils for plant growth-promoting activities. Applied biochemistry and biotechnology, 167(6), 1653-1667.

Hemambika, B., Balasubramanian, V., Rajesh Kannan, V., & Arthur James, R. (2013). Screening of chromium-resistant bacteria for plant growth-promoting activities. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 22(7), 717-736.

Herath, H. M. L. I., Rajapaksha, A. U., Vithanage, M., & Seneviratne, G. (2014). Developed fungal–bacterial biofilms as a novel tool for bioremoval of hexavelant chromium from wastewater. Chemistry and Ecology, 30(5), 418-427.

Hill, M. K. (2010). Understanding Environmental Pollution, Cambridge University Press. New York, 534.

Hitrec, P., & Muic, M. (2005). Influence of different concentrations of $Al_2 (SO_4)_3$ and anionic polyelectrolytes on tannery wastewater flocculation. Desalination, 171(1), 13-20.

Hlihor, R. M., Figueiredo, H., Tavares, T., & Gavrilescu, M. (2017). Biosorption potential of dead and living *Arthrobacter viscosus* biomass in the removal of Cr(VI): batch and column studies. Process Safety and Environmental Protection, 108, 44-56.

Hodomihou, N., Feder, F., Masse, D., Kossi, E., Amadji, G., Ndour-Badiane, Y., & Doelsch, E. (2016). Diagnostic de contamination des agrosystèmes périurbains de Dakar par les éléments traces métalliques. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 20(3), 397-407.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual of determinate bacteriology. The Williams and Wilkins Comp. Baltimore 9th edition.

Hu, W., Chen, Y., Huang, B., & Niedermann, S. (2014). Health risk assessment of heavy metals in soils and vegetables from a typical greenhouse vegetable production system in China. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 20(5), 1264-1280.

Huang, Y., Zeng, Q., Hu, L., Zhong, H., & He, Z. (2021a). Bioreduction performances and mechanisms of Cr(VI) by *Sporosarcina saromensis* W5, a novel Cr(VI)-reducing facultative anaerobic bacteria. Journal of Hazardous Materials, 413, 125411.

Huang, Y., Zeng, Q., Hu, L., Xiong, D., Zhong, H., & He, Z. (2021b). Column study of enhanced Cr(VI) removal and removal mechanisms by *Sporosarcina saromensis* W5 assisted bio-permeable reactive barrier. Journal of Hazardous Materials, 405, 124115.

Hussain, F., Malik, S. A., Athar, M., Bashir, N., Younis, U., Hassan, M., & Mahmood, S. (2010). Effect of tannery effluents on seed germination and growth of two sunflower cultivars. African Journal of Biotechnology, 9(32), 5113-5120.

I

Ibrahim, A. S., El-Tayeb, M. A., Elbadawi, Y. B., Al-Salamah, A. A., & Antranikian, G. (2012). Hexavalent chromate reduction by alkaliphilic *Amphibacillus* sp. KSUCr3 is mediated by copper-dependent membrane-associated Cr(VI) reductase. Extremophiles, 16(4), 659-668.

Ishibashi, Y., Cervantes, C., & Silver, S. (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. Applied and Environmental Microbiology, 56(7), 2268-2270.

J

Jiang, B., Gong, Y., Gao, J., Sun, T., Liu, Y., Oturan, N., & Oturan, M. A. (2019). The reduction of Cr(VI) to Cr(III) mediated by environmentally relevant carboxylic acids: state-of-the-art and perspectives. Journal of Hazardous Materials, 365, 205-226.

Jin, R., Wang, B., Liu, G., Wang, Y., Zhou, J., & Wang, J. (2017). Bioreduction of Cr(VI) by *Acinetobacter* sp. WB-1 during simultaneous nitrification/denitrification process. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 92(3), 649-656.

Jobby, R., Jha, P., Yadav, A. K., & Desai, N. (2018). Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr(VI)]: a comprehensive review. Chemosphere, 207, 255-266.

Jourdan, B., Piantone, P., Lerouge, C., & Guyonnet, D. (2005). Atténuation des métaux à l'aval de sites de stockage de déchets. Synthèse bibliographique. Rapport BRGM/RP-54417-FR, 110.

Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., Abed, S. E., & Ghachtouli, N. E. (2011). Remediation of hexavalent chromium by consortia of indigenous bacteria from tannery waste-contaminated biotopes in Fez, Morocco. International journal of environmental studies, 68(6), 901-912.

Joutey, N. T, Bahafid, W., Sayel, H., Ananou, S., & El Ghachtouli, N. (2014). Hexavalent chromium removal by a novel *Serratia proteamaculans* isolated from the bank of Sebou River (Morocco). Environmental Science and Pollution Research, 21(4), 3060-3072.

Joutey, N. T., Sayel, H., Bahafid, W., & Ghachtouli, N. E. (2015). Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 233, 45-69.

Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., Nassef, S., & El Ghachtouli, N. (2016). *Leucobacter chromiireducens* CRB2, a new strain with high Cr(VI) reduction potential isolated from tannery-contaminated soil (Fez, Morocco). Annals of microbiology, 66(1), 425-436.

Joyia, F. A., Ashraf, M. Y., Shafiq, F., Anwar, S., Khaliq, B., & Malik, A. (2021). Phytotoxic effects of varying concentrations of leather tannery effluents on cotton and brinjal. Agricultural Water Management, 246, 106707.

Juhnke, S., Peitzsch, N., Hübener, N., Große, C., & Nies, D. H. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. Archives of microbiology, 179(1), 15-25.

K

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.

Kader, J., Sannasi, P., Othman, O., Ismail, B. S., & Salmijah, S. (2007). Removal of Cr(VI) from aqueous solutions by growing and non-growing populations of environmental bacterial consortia. Global Journal of Environmental Research, 1(1), 12-17.

Kadiiska, M. B., Xiang, Q. H., & Mason, R. P. (1994). In vivo free radical generation by chromium (VI): an electron spin resonance spin-trapping investigation. Chemical research in toxicology, 7(6), 800-805.

Kalola, V., & Desai, C. (2020). Biosorption of Cr(VI) by *Halomonas* sp. DK4, a halotolerant bacterium isolated from chrome electroplating sludge. Environmental Science and Pollution Research, 27(22), 27330-27344.

Kalsoom, A., Batool, R., & Jamil, N. (2021). Highly Cr(VI)-tolerant *Staphylococcus simulans* assisting chromate evacuation from tannery effluent. Green Processing and Synthesis, 10(1), 295-308.

Kamaludeen, S. P., Megharaj, M., Juhasz, A. L., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2003). Chromium-microorganism interactions in soils: remediation implications. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 93-164.

Kamnev, A. A. (2008). FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling. Spectroscopy, 22(2-3), 83-95.

Kang, S. Y., Lee, J. U., & Kim, K. W. (2007). Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) onto the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochemical Engineering Journal, 36(1), 54-58.

Kang, C., Wu, P., Li, Y., Ruan, B., Li, L., Tran, L., & Dang, Z. (2015). Understanding the role of clay minerals in the chromium (VI) bioremoval by *Pseudomonas aeruginosa*

CCTCC AB93066 under growth condition: microscopic, spectroscopic and kinetic analysis. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(11), 1765-1779.

Kanmani, P., Aravind, J., & Preston, D. (2012). Remediation of chromium contaminants using bacteria. International Journal of Environmental Science and Technology, 9(1), 183-193.

Karega, S., Bhargavi, M., & Divekar, S. V. (2015). Treatment of wastewater from chrome plating industry by ion exchange method. International Journal of Research in Engineering and Technology, 4(7), 393-401.

Karthik, C., Oves, M., Thangabalu, R., Sharma, R., Santhosh, S. B., & Arulselvi, P. I. (2016). *Cellulosimicrobium funkei*-like enhances the growth of *Phaseolus vulgaris* by modulating oxidative damage under Chromium (VI) toxicity. Journal of advanced research, 7(6), 839-850.

Karthik, C., Barathi, S., Pugazhendhi, A., Ramkumar, V. S., Thi, N. B. D., & Arulselvi, P. I. (2017). Evaluation of Cr(VI) reduction mechanism and removal by *Cellulosimicrobium funkei* strain AR8, a novel haloalkaliphilic bacterium. Journal of hazardous materials, 333, 42-53.

Kathiravan, M. N., Karthick, R., Muthu, N., Muthukumar, K., & Velan, M. (2010). Sonoassisted microbial reduction of chromium. Applied biochemistry and biotechnology, 160(7), 2000-2013.

Khan, A. G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. Journal of trace Elements in Medicine and Biology, 18(4), 355-364.

Khanafari, A., Eshgh, D. S., & Mashinchian, A. (2008). Removal of lead and chromium from aqueous solution by *Bacillus circulans* biofilm.

Khattar, J. I. S., Parveen, S., Singh, Y., Singh, D. P., & Gulati, A. (2015). Intracellular uptake and reduction of hexavalent chromium by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PUPCCC 62. Journal of Applied Phycology, 27(2), 827-837.

Kilicel, F., & Dag, B. (2006). The relationship between some heavy metal concentrations in soils, leaves and fruits of starking delicious (*Malus communis* Lam.) in Van, Turkey. Reviews in Analytical Chemistry, 25(4), 271-284.

Konovalova, V. V., Dmytrenko, G. M., Nigmatullin, R. R., Bryk, M. T., & Gvozdyak, P. I. (2003). Chromium (VI) reduction in a membrane bioreactor with immobilized *Pseudomonas* cells. Enzyme and Microbial Technology, 33(7), 899-907.

Kornhauser, C., Wrobel, K., Wrobel, K., Malacara, J. M., Nava, L. E., Gómez, L., & González, R. (2002). Possible adverse effect of chromium in occupational exposure of tannery workers. Industrial health, 40(2), 207-213.

Kouakou, K. J., Gogbeu, S. J., Sika, A. E., Yao, K. B., Bounakhla, M., Zahry, F., & Bekro, Y. A. (2019). Caractérisation physico-chimique des horizons de surface de sols à maraîchers dans la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire). International Journal of Biological and Chemical Sciences, 13(2), 1193-1200.

Kourtev, P. S., Nakatsu, C. H., & Konopka, A. (2009). Inhibition of nitrate reduction by chromium (VI) in anaerobic soil microcosms. Applied and Environmental Microbiology, 75(19), 6249-6257.

Ksheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P., & Koloczek, H. (2005). Chromium (III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. Process Biochemistry, 40(5), 1565-1572.

Ksheminska, H., Honchar, T., Gayda, G., & Gonchar, M. (2006). Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures. Open Life Sciences, 1(1), 137-149.

Ksheminska, H., Fedorovych, D., Honchar, T., Ivash, M., & Gonchar, M. (2008). Yeast tolerance to chromium depends on extracellular chromate reduction and Cr(III) chelation. Food Technology and Biotechnology, 46(4), 419-426.

Kumar, P., & Chandra, R. (2004). Detoxification of distillery effluent through *Bacillus thuringiensis* (MTCC 4714) enhanced phytoremediation potential of *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schliden. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 73(5), 903-910.

Kumar, D., Tripathi, D. K., & Chauhan, D. K. (2014). Phytoremediation potential and nutrient status of *Barringtonia acutangula* Gaerth. Tree seedlings grown under different chromium (CrVI) treatments. Biological trace element research, 157(2), 164-174.

Kumar, M., & Saini, H. S. (2019). Reduction of hexavalent chromium (VI) by indigenous alkaliphilic and halotolerant *Microbacterium* sp. M5: comparative studies under growth and nongrowth conditions. Journal of applied microbiology, 127(4), 1057-1068.

Kumari, V., Yadav, A., Haq, I., Kumar, S., Bharagava, R. N., Singh, S. K., & Raj, A. (2016). Genotoxicity evaluation of tannery effluent treated with newly isolated hexavalent chromium reducing *Bacillus cereus*. Journal of environmental management, 183, 204-211.

Kuroda, M., Watanabe, T., & Umedu, Y. (1997). Simultaneous COD removal and denitrification of wastewater by bio-electro reactors. Water science and technology, 35(8), 161-168.

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259), 680-685.

Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A. V., & Vanderleyden, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. Trends in microbiology, 8(7), 298-300.

Lee, D. W., & Yoo, B. R. (2016). Advanced silica/polymer composites: Materials and applications. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 38, 1-12.

Lelchat, F. (2014). Enzymes de dépolymérisation d'exopolysaccharides bactériens marins, Enzymes for the depolymerization of marine bacterial exopolysaccharides (DEPOLYS) (Doctoral dissertation, Université de Bretagne occidentale).

Li, B., Pan, D., Zheng, J., Cheng, Y., Ma, X., Huang, F., & Lin, Z. (2008). Microscopic investigations of the Cr(VI) uptake mechanism of living *Ochrobactrum anthropi*. Langmuir, 24(17), 9630-9635.

Li, M., He, Z., Hu, Y., Hu, L., & Zhong, H. (2019). Both cell envelope and cytoplasm were the locations for chromium (VI) reduction by *Bacillus* sp. M6. Bioresource technology, 273, 130-135.

Lian, G., Wang, B., Lee, X., Li, L., Liu, T., & Lyu, W. (2019). Enhanced removal of hexavalent chromium by engineered biochar composite fabricated from phosphogypsum and distillers grains. Science of the Total Environment, 697, 134119.

Liu, J., Ding, G., Gai, Z., Zhang, W., Han, Y., & Li, W. (2020). Changes in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* under chromium stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 193, 110302.

Lofrano, G., Meriç, S., Zengin, G. E., & Orhon, D. (2013). Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: a review. Science of the Total Environment, 461, 265-281.

Long, D., Tang, X., Cai, K., Chen, G., Chen, L., Duan, D., & Chen, Y. (2013a). Cr(VI) reduction by a potent novel alkaliphilic halotolerant strain *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10. Journal of hazardous materials, 256, 24-32.

Long, D., Tang, X., Cai, K., Chen, G., Shen, C., Shi, J., & Chen, Y. (2013b). Cr(VI) resistance and removal by indigenous bacteria isolated from chromium-contaminated soil. Journal of microbiology and biotechnology, 23(8), 1123-1132.

Lorck, H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. Physiologia Plantarum, 1(2), 142-146.

Lotfy, S. M., & Mostafa, A. Z. (2014). Phytoremediation of contaminated soil with cobalt and chromium. Journal of Geochemical Exploration, 144, 367-373.

Loukidou, M. X., Zouboulis, A. I., Karapantsios, T. D., & Matis, K. A. (2004). Equilibrium and kinetic modeling of chromium (VI) biosorption by *Aeromonas caviae*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 242(1-3), 93-104.

Lovley, D. R. (1993). Dissimilatory metal reduction. Annual review of microbiology, 47(1), 263-290.

Lovely, D. R. (1995). Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. Advances in agronomy (USA), 54, 175-231.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry, 193, 265-275.

Lytle, C. M., Lytle, F. W., Yang, N., Qian, J. H., Hansen, D., Zayed, A., & Terry, N. (1998). Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: potential for in situ heavy metal detoxification. Environmental Science & Technology, 32(20), 3087-3093.

M

Ma, X., Wang, Z., Yin, Z., & Koenig, A. (2008). Nitrogen flow analysis in Huizhou, south China. Environmental management, 41(3), 378-388.

Ma, L., Xu, J., Chen, N., Li, M., & Feng, C. (2019). Microbial reduction fate of chromium (Cr) in aqueous solution by mixed bacterial consortium. Ecotoxicology and environmental safety, 170, 763-770.

Mabbett, A. N., & Macaskie, L. E. (2001). A novel isolate of *Desulfovibrio* sp. with enhanced ability to reduce Cr(VI). Biotechnology Letters, 23(9), 683-687.

Mabrouki, Y., Taybi, A. F., Bensaad, H., & Berrahou, A. (2016). Spatiotemporal variability in the quality of running waters of the Oued Za (Eastern Morocco). J Mater Environ Sci, 7(1), 231-243.

McCartor, A., Becker, D. (2010). World's Worst Pollution Problems Report. Blacksmith Institute, New York, NY. pp 76.

Mahmood, S., Khalid, A., Mahmood, T., Arshad, M., & Ahmad, R. (2013). Potential of newly isolated bacterial strains for simultaneous removal of hexavalent chromium and reactive black-5 azo dye from tannery effluent. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 88(8), 1506-1513.

Mahmoud, M. S., & Mohamed, S. A. (2017). Calcium alginate as an eco-friendly supporting material for Baker's yeast strain in chromium bioremediation. HBRC journal, 13(3), 245-254.

Mala, J. G. S., Sujatha, D., & Rose, C. (2015). Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation. Microbiological Research, 170, 235-241.

Malaviya, P., & Singh, A. (2016). Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters. Critical reviews in microbiology, 42(4), 607-633.

Mangaiyarkarasi, M. M., Vincent, S., Janarthanan, S., Rao, T. S., and Tata, B. V. R. (2011). Bioreduction of Cr(VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. Saudi journal of biological sciences, 18(2), 157-167.

Mangkoedihardjo, S., Ratnawati, R., & Alfianti, N. (2008). Phytoremediation of hexavalent chromium polluted soil using *Pterocarpus indicus* and *Jatropha curcas* L. World Appl Sci J, 4(3), 338-342.

Mannucci, A., Munz, G., Mori, G., & Lubello, C. (2010). Anaerobic treatment of vegetable tannery wastewaters: a review. Desalination, 264(1-2), 1-8.

Marchal, N., Bourdon, J. L., Richard, C. (1991). The culture media for the isolation and biochemical identification of bacteria (Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries) in french. Doin Editors - Paris.

Martin, S., & Griswold, W. (2009). Human health effects of heavy metals. Environmental Science and Technology briefs for citizens, 15, 1-6.

Martorell, M. M., Fernández, P. M., Fariña, J. I., & Figueroa, L. I. (2012). Cr(VI) reduction by cell-free extracts of *Pichia jadinii* and *Pichia anomala* isolated from textile-dye factory effluents. International Biodeterioration & Biodegradation, 71, 80-85.

Masoumbeigi, H., & Rezaee, A. (2015). Removal of Methylene Blue (MB) dye from synthetic wastewater using UV/H2O2 advanced oxidation process. Journal of Health Policy and Sustainable Health, 2(1).

McCullough, J., Hazen, T., Benson, S., Blaine-Meyying, F., Palmisano, A. C. (1999). Bioremediation of Metals and radionuclides. US Dept. Of Energy. Office of Biological and Environmental Research, Germantown. MC 20874.

McLean, J. S., Beveridge, T. J., & Phipps, D. (2000). Isolation and characterization of a chromium-reducing bacterium from a chromated copper arsenate-contaminated site. Environmental Microbiology, 2(6), 611-619.

Meegoda, J. N., Kamolpornwijit, W., & Batagoda, J. H. (2017). A detailed laboratory scale feasibility study of recovering metallic iron and chromium from chromium contaminated soils. Indian Geotechnical Journal, 47(4), 437-444.

Mendez, M. O., Neilson, J. W., & Maier, R. M. (2008). Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site. Applied and environmental microbiology, 74(12), 3899-3907.

Metarfi, Y., El Rhazi, K., El Madani, F. Z., Omor, A., & Rais, Z. (2018). Risques professionnels liés à la manipulation du chrome au sein des tanneries modernes de la ville de Fès, Maroc. Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique, 66, S187.

Michel, C., Brugna, M., Aubert, C., Bernadac, A., & Bruschi, M. (2001). Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 55(1), 95-100.

Mishra, S., & Verma, N. (2016). Carbon bead-supported hollow carbon nanofibers synthesized *via* templating method for the removal of hexavalent chromium. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 36, 346-354.

Misra, S., & Mani, D. (2009). Soil pollution. New Delhi, India: S. B Nangia APH publishing corporation. Pp 29-59.

Mistry, K., Desai, C., Lal, S., Patel, K., & Patel, B. (2010). Hexavalent chromium reduction by *Staphylococcus* sp. isolated from Cr(VI) contaminated land fill. International Journal of Biotechnology and Biochemistry, 6(1), 117-129.

Mohapatra, R. K., Parhi, P. K., Thatoi, H., & Panda, C. R. (2017). Bioreduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium indicum* strain MW1 isolated from marine water of Paradip Port, Odisha, India. Chemistry and Ecology, 33(2), 114-130.

Morais, P. V., Branco, R., & Francisco, R. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bvl1 a strain highly resistant. Biometals, 24(3), 401-410.

Morse, J. W., & Luther Iii, G. W. (1999). Chemical influences on trace metal-sulfide interactions in anoxic sediments. Geochimica et Cosmochimica Acta, 63(19-20), 3373-3378.

Mulligan, C. N., & Yong, R. N. (2004). Natural attenuation of contaminated soils. Environment international, 30(4), 587-601.

Murugavelh, S., & Mohanty, K. (2012). Bioreduction of hexavalent chromium by free cells and cell free extracts of *Halomonas* sp. Chemical engineering journal, 203, 415-422.

Murugavelh, S., & Mohanty, K. (2013). Isolation, identification and characterization of Cr(VI) reducing *Bacillus cereus* from chromium contaminated soil. Chemical Engineering Journal, 230, 1-9.

Mutin, G. (2009). Le Monde arabe face au défi de l'eau. Enjeux et Conflits. Institut d'Etudes Politiques de Lyon. Hal-00352860, version, 2.

N

Naglak, T. J., & Wang, H. Y. (1990). Recovery of a foreign protein from the periplasm of *Escherichia coli* by chemical permeabilization. Enzyme and microbial Technology, 12(8), 603-611.

Nakkeeran, E., Patra, C., Shahnaz, T., Rangabhashiyam, S., & Selvaraju, N. J. B. T. R. (2018). Continuous biosorption assessment for the removal of hexavalent chromium from aqueous solutions using *Strychnos nux* vomica fruit shell. Bioresource Technology Reports, 3, 256-260.

Narayani, M., & Shetty, K. V. (2013). Chromium-resistant bacteria and their environmental condition for hexavalent chromium removal: a review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 43(9), 955-1009.

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS microbiology Letters, 170(1), 265-270.

Neto, A. D., de Castro Dantas, T. N., & Moura, M. A. (2004). Evaluation and optimization of chromium removal from tannery effluent by microemulsion in the Morris extractor. Journal of hazardous materials, 114(1-3), 115-122.

Ngwenya, N., & Chirwa, E. M. N. (2011). Biological removal of cationic fission products from nuclear wastewater. Water Science and Technology, 63(1), 124-128.

Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. Applied microbiology and biotechnology, 51(6), 730-750.

Noorjahan, C. M. (2014). Physicochemical characteristics, identification of bacteria and biodegradation of industrial effluent. Journal of bioremediation and Biodegradation, 5(3).

O

Okeke, B. C., Laymon, J., Crenshaw, S., & Oji, C. (2008). Environmental and kinetic parameters for Cr(VI) bioreduction by a bacterial monoculture purified from Cr(VI)-resistant consortium. Biological trace element research, 123(1), 229-241.

Oliveira, H. (2012). Chromium as an environmental pollutant: insights on induced plant toxicity. Journal of Botany.

Omor, A., El Rhazi, K., Taleb, N. E. M., Taleb, A., Rais, Z., & Chetouani, A. (2019). Characterization and treatment of effluents loaded with sulphides from two tanneries: Modern and Artisanal. Moroccan Journal of Chemistry, 7(1), 7-1.

Öncel, I., Keleş, Y., & Üstün, A. S. (2000). Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. Environmental pollution, 107(3), 315-320.

Opperman, D. J., & Van Heerden, E. (2008a). A membrane-associated protein with Cr(VI)-reducing activity from *Thermus scotoductus* SA-01. FEMS microbiology letters, 280(2), 210-218.

Opperman, D. J., Piater, L. A., & van Heerden, E. (2008b). A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. Journal of bacteriology, 190(8), 3076-3082.

Ouryachi, M. (1999). Contribution au traitement et à la valorization des déchets solides et liquides de tanneries et de dinanderies implantées à Fès. Thèse de doctorat de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah.

P

Pal, A., Dutta, S., & Paul, A. K. (2005). Reduction of hexavalent chromium by cell-free extract of *Bacillus sphaericus* AND 303 isolated from serpentine soil. Current Microbiology, 51(5), 327-330.

Pal, A., & Paul, A. (2008). Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. Indian journal of microbiology, 48(1), 49-64.

Panda, S. K., & Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. Brazilian journal of plant physiology, 17, 95-102.

Pang, Y., Zeng, G. M., Tang, L., Zhang, Y., Liu, Y. Y., Lei, X. X., & Liu, C. (2011). Cr(VI) reduction by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized in a polyvinyl alcohol/sodium alginate matrix containing multi-walled carbon nanotubes. Bioresource Technology, 102(22), 10733-10736.

Pant, D., & Adholeya, A. (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. Bioresource technology, 98(12), 2321-2334.

Park, C. H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S., & Matin, A. (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. Applied and Environmental Microbiology, 66(5), 1788-1795.

Park, C. H., Gonzalez, C., Ackerley, D., Keyhan, M., & Matin, A. (2002). Molecular engineering of soluble bacterial proteins with chromate reductase activity. Remediation and beneficial reuse of contaminated sediments, 103-112.

Pattanapipitpaisal, P., Brown, N., & Macaskie, L. (2001). Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site. Applied Microbiology and Biotechnology, 57(1), 257-261.

Pechova, A., & Pavlata, L. (2007). Chromium as an essential nutrient: a review. Veterinární medicína, 52(1), 1.

Pei, Q. H., Shahir, S., Santhana Raj, A. S., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2009). Chromium (VI) resistance and removal by *Acinetobacter haemolyticus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(6), 1085-1093.

Polti, M. A., Amoroso, M. J., & Abate, C. M. (2010). Chromate reductase activity in *Streptomyces* sp. MC1. The Journal of General and Applied Microbiology, 56(1), 11-18.

Polti, M. A., Amoroso, M. J., & Abate, C. M. (2011). Intracellular chromium accumulation by *Streptomyces* sp. MC1. Water, Air, & Soil Pollution, 214(1), 49-57.

Poopal, A. C., & Laxman, R. S. (2008). Hexavalent chromate reduction by immobilized *Streptomyces griseus*. Biotechnology letters, 30(6), 1005-1010.

Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., & Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. Reviews of environmental contamination and toxicology volume 213, 113-136.

Pradhan, D., Sukla, L. B., Sawyer, M., & Rahman, P. K. (2017). Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 55, 1-20.

Pradhan, D., Sukla, L. B., Mishra, B. B., & Devi, N. (2019). Biosorption for removal of hexavalent chromium using microalgae *Scenedesmus* sp. Journal of Cleaner Production, 209, 617-629.

Prasad, K. S., Ramanathan, A. L., Paul, J., Subramanian, V., & Prasad, R. (2013). Biosorption of arsenite (As^{+3}) and arsenate (As^{+5}) from aqueous solution by *Arthrobacter* sp. biomass. Environmental technology, 34(19), 2701-2708.

Premono, M. E., Moawad, A. M., & Vlek, P. L. G. (1996). Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere (No. REP-12113.

Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., (2003). Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2ème édition Pp: 1164.

Priester, J. H., Olson, S. G., Webb, S. M., Neu, M. P., Hersman, L. E., & Holden, P. A. (2006). Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 72(3), 1988-1996.

Q

Qian, J., Wei, L., Liu, R., Jiang, F., Hao, X., & Chen, G. H. (2016). An exploratory study on the pathways of Cr(VI) reduction in sulfate-reducing up-flow anaerobic sludge bed (UASB) reactor. Scientific reports, 6(1), 1-12.

Quartacci, M. F., Argilla, A., Baker, A. J. M., & Navari-Izzo, F. (2006). Phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by Indian mustard. Chemosphere, 63(6), 918-925.

Quintelas, C., Fonseca, B., Silva, B., Figueiredo, H., & Tavares, T. (2009). Treatment of chromium (VI) solutions in a pilot-scale bioreactor through a biofilm of *Arthrobacter viscosus* supported on GAC. Bioresource Technology, 100(1), 220-226.

R

Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moënne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and soil, 321(1), 341-361.

Raj, A., Kumar, S., Haq, I., & Kumar, M. (2014). Detection of tannery effluents induced DNA damage in mung bean by use of random amplified polymorphic DNA markers. International Scholarly Research Notices, 2014.

Rama Devi, D., Srinivasan, G., Kothandaraman, S., & Ashok Kumar, S. (2021). State-of-the-Art Review—Methods of Chromium Removal from Water and Wastewater. Sustainable Practices and Innovations in Civil Engineering, 37-51.

Ramasami, T., & Prasad, B. G. S. (1991). Environmental aspects of leather processing. Proceedings of the Lexpo–XV, Calcutta, India, 43.

Ramdani, M., Taybi, A. F., Mabrouki, Y., Haloui, B., El Asri, O., Elmsellem, H., & Mostareh, M. (2017). The spatial variability of water quality in the Mediterranean of eastern Morocco. Moroccan Journal of Chemistry, 5(2), 5-2.

Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. Biometals, 21(3), 321-332.

Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C., Ávila-Rodríguez, M., Lappe, P., Ulloa, M., Vázquez-Juárez, R., & Félix Gutiérrez-Corona, J. (2004). Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. Antonie van Leeuwenhoek, 85(1), 63-68.

Ramkrishan, K. T., & Sivasubramanian, C. (2013). Bioremediation of organic pollutants by using free and immobilised cells of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. Asian Journal of Environmental Science, 8(1), 22-27.

Ranieri, E., Moustakas, K., Barbafieri, M., Ranieri, A. C., Herrera-Melián, J. A., Petrella, A., & Tommasi, F. (2020). Phytoextraction technologies for mercury-and chromium-contaminated soil: a review. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 95(2), 317-327.

Raspor, P., Batič, M., Jamnik, P., Josić, D., Milačič, R., Paš, M., & Skrt, M. (2000). The influence of chromium compounds on yeast physiology: (A review). Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 47(2-3), 143-173.

Rath, B. P., Das, S., Mohapatra, P. K. D., & Thatoi, H. (2014). Optimization of extracellular chromate reductase production by *Bacillus amyloliquefaciens* (CSB 9) isolated from chromite mine environment. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(3), 35-41.

Rath, B. P., Das, S., & Thatoi, H. (2019). Bioremediation Efficacy of Extracellular Chromate Reductase from *Bacillus amyloliquefaciens* (CSB 9) for Detoxification of Hexavalent Chromium. In Environmental Biotechnology For Soil and Wastewater Implications on Ecosystems (pp. 109-115). Springer, Singapore.

Rawat, M., Rawat, A. P., Giri, K., & Rai, J. P. N. (2013). Cr(VI) sorption by free and immobilised chromate-reducing bacterial cells in PVA–alginate matrix: equilibrium isotherms and kinetic studies. Environmental Science and Pollution Research, 20(8), 5198-5211.

Rehman, F., & Faisal, M. (2015). Toxic hexavalent chromium reduction by *Bacillus pumilis*, *Cellulosimicrobium cellulans* and *Exiguobacterium*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 33(3), 585-589.

Ren, G., Jin, Y., Zhang, C., Gu, H., & Qu, J. (2015). Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb(II). Ecotoxicology and environmental safety, 117, 141-148.

Renzoni, A., Zino, F., & Franchi, E. (1998). Mercury levels along the food chain and risk for exposed populations. Environmental Research, 77(2), 68-72.

Richardson, A. D., Duigan, S. P., & Berlyn, G. P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. New phytologist, 153(1), 185-194.

Rocha, O. P., & De Oliveira, D. P. (2017). Investigation of a Brazilian tannery effluent by means of zebra fish (*Danio rerio*) embryo acute toxicity (FET) test. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 80(19-21), 1078-1085.

Rodier J., (2009). Analysis of Water – Fresh Water, Wastewater, Seawater, 9th ed., Paris, Dunod, 1475 p.

Rodriguez-Palenzuela, P., Burr, T. J., & Collmer, A. (1991). Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. Journal of Bacteriology, 173(20), 6547-6552.

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology advances, 17(4-5), 319-339.

Romanenko, V. I., & Koren'Kov, V. N. (1977). Pure culture of bacteria using chromates and bichromates as hydrogen acceptors during development under anaerobic conditions. Mikrobiologiia, 46(3), 414-417.

Ross, D. S., Sjogren, R. E., & Bartlett, R. J. (1981). Behavior of chromium in soils: IV. Toxicity to microorganisms (Vol. 10, No. 2, pp. 145-148). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.

Rossi, F., Jullian, V., Pawlowiez, R., Kumar-Roiné, S., Haddad, M., Darius, H. T., & Laurent, D. (2012). Protective effect of *Heliotropium foertherianum* (Boraginaceae) folk remedy and its active compound, rosmarinic acid, against a Pacific ciguatoxin. Journal of ethnopharmacology, 143(1), 33-40.

Rota, C., Carraminana, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. Journal of food protection, 67(6), 1252-1256.

Roundhill, D. M., & Koch, H. F. (2002). Methods and techniques for the selective extraction and recovery of oxoanions. Chemical Society Reviews, 31(1), 60-67.

Rusan, H., Kamre, L., & Manser, T. (2007). Wastewater irrigation impacts on crops with respect to heavy metals. Crop Sci, 5, 114-118.

Ryan, D. R., Leukes, W. D., & Burton, S. G. (2005). Fungal bioremediation of phenolic wastewaters in an airlift reactor. Biotechnology progress, 21(4), 1068-1074.

S

Saha, B., & Orvig, C. (2010). Biosorbents for hexavalent chromium elimination from industrial and municipal effluents. Coordination Chemistry Reviews, 254(23-24), 2959-2972.

Salano, E. M. (2013). Assessment of Heavy Metal Pollution in Soils and Water of Samburu County. Kenya (Master Thesis, Kenyatta University, Kenya).

Samuel, M. S., & Chidambaram, R. (2015). Hexavalent chromium biosorption studies using *Penicillium griseofulvum* MSR1 a novel isolate from tannery effluent site: Box–Behnken optimization, equilibrium, kinetics and thermodynamic studies. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 49, 156-164.

Sanayei, Y., Ismail, N., & Talebi, S. M. (2009). Determination of heavy metals in Zayandeh Rood river, Isfahan-Iran. World Applied Sciences Journal, 6(9), 1209-1214.

Sangeetha, R., Kamalahasan, B., & Karthi, N. (2012). Use of tannery effluent for irrigation: an evaluative study on the response of antioxidant defenses in maize (Zea mays).

Sannasi, P., Kader, J., Ismail, B. S., & Salmijah, S. (2006). Sorption of Cr(VI), Cu(II) and Pb(II) by growing and non-growing cells of a bacterial consortium. Bioresource technology, 97(5), 740-747.

Sarangi, A., & Krishnan, C. (2008). Comparison of in vitro Cr(VI) reduction by CFEs of chromate resistant bacteria isolated from chromate contaminated soil. Bioresource technology, 99(10), 4130-4137.

Saravanan, A., Kumar, P. S., & Yashwanthraj, M. (2017). Sequestration of toxic Cr(VI) ions from industrial wastewater using waste biomass: a review. Desalin Water Treat, 68, 245-266.

Sarker, B. C., Basak, B., & Islam, M. S. (2013). Chromium effects of tannery waste water and appraisal of toxicity strength reduction and alternative treatment. International Journal of Agronomy and Agricultural Research, 3(11), 23-35.

Sas, W., Głuchowski, A., Radziemska, M., Dzięcioł, J., & Szymański, A. (2015). Environmental and geotechnical assessment of the steel slags as a material for road structure. Materials, 8(8), 4857-4875.

Saxena, G., Chandra, R., & Bharagava, R. N. (2016). Environmental pollution, toxicity profile and treatment approaches for tannery wastewater and its chemical pollutants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 240, 31-69.

Sayler, G. S., & Ripp, S. (2000). Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. Current opinion in biotechnology, 11(3), 286-289.

Schulze, E. D., & Mooney, H. A. (1994). Ecosystem function of biodiversity: a summary. In Biodiversity and ecosystem function (pp. 497-510). Springer, Berlin, Heidelberg.

Secat, L. A, Gallego, H. (2013). Annuaire IE de la Méditerranée. Annexes ; La Méditerranée en chiffres, p 443.

Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., ... & Rashid, M. I. (2017). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. Chemosphere, 178, 513-533.

Shanker, A. K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C. N., & Pathmanabhan, G. (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. cv CO 4) roots. Plant Science, 166(4), 1035-1043.

Sharma, S., & Adholeya, A. (2011). Detoxification and accumulation of chromium from tannery effluent and spent chrome effluent by *Paecilomyces lilacinus* fungi. International Biodeterioration & Biodegradation, 65(2), 309-317.

Sheng, X. F., Xia, J. J., Jiang, C. Y., He, L. Y., & Qian, M. (2008). Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. Environmental pollution, 156(3), 1164-1170.

Shim, J., Shea, P. J., Lim, J. M., & Oh, B. T. (2016). Simultaneous Cr(VI) reduction and methylene blue removal by *Bacillus* sp. JH2-2 isolated from mining site soil. Desalination and Water Treatment, 57(15), 7021-7028.

Shruthi, S., Raghavendra, M. P., Swarna Smitha, H. S., & Girish, K. (2012). Bioremediation of rubber processing industry effluent by *Pseudomonas* sp. International Journal of Research in Environmental Science and Technology, 2(2), 27-30.

Singh, S., & Sinha, S. (2005). Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea* (L.) Czern. (cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste. Ecotoxicology and Environmental Safety, 62(1), 118-127.

Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). PLos one, 11(6), e0155026.

Sivakumar, D. (2016). Biosorption of hexavalent chromium in a tannery industry wastewater using fungi species. Global Journal of Environmental Science and Management, 2(2), 105-124.

Sivaprakasam, S., Mahadevan, S., Sekar, S., & Rajakumar, S. (2008). Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. Microbial cell factories, 7(1), 1-7.

Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. Environmental pollution, 100(1-3), 179-196.

Smouni, A., Ater, M., Auguy, F., Laplaze, L., El Mzibri, M., Berhada, F., & Doumas, P. (2010). Évaluation de la contamination par les éléments-traces métalliques dans une zone minière du Maroc oriental. Cahiers Agricultures, 19(4), 273-279.

Sneddon, C. (2012). Chromium and its negative effects on the environment. Case Study. Department of Earth Sciences, Montana State University.

Somasundaram, V., Philip, L., & Bhallamudi, S. M. (2009). Experimental and mathematical modeling studies on Cr(VI) reduction by CRB, SRB and IRB, individually and in combination. Journal of Hazardous Materials, 172(2-3), 606-617.

Soni, S. K., Singh, R., Awasthi, A., Singh, M., & Kalra, A. (2013). In vitro Cr(VI) reduction by cell-free extracts of chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil. Environmental Science and Pollution Research, 20(3), 1661-1674.

Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W., & Garg, S. K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. Chemosphere, 48(4), 427-435.

Srinivas, G., & Estari, M. (2013). Studies of efficiency of immobilizedbacteria in tannery effluent treatment. Journal of Bio Innovation, 2(2), 33-42.

Stambulska, U. Y., Bayliak, M. M., & Lushchak, V. I. (2018). Chromium (VI) toxicity in legume plants: modulation effects of rhizobial symbiosis. BioMed research international, 2018.

State Secretariat for Water and Environment, Moroccan Laws Relating to the Environment, (2013). Official bulletin N◦ 6199 Du 22 Hija 1434, Department of the Environment.

Steel, K. J. (1961). The oxidase reaction as a taxonomic tool. Microbiology, 25(2), 297-306.

Stoop, M. L. M. (2003). Water management of production systems optimised by environmentally oriented integral chain management: case study of leather manufacturing in developing countries. Technovation, 23(3), 265-278.

Su, Y. Q., Zhao, Y. J., Wu, N., Chen, Y. E., Zhang, W. J., Qiao, D. R., & Cao, Y. (2018). Chromium removal from solution by five photosynthetic bacteria isolates. Applied microbiology and biotechnology, 102(4), 1983-1995.

Su, Y. Q., Yuan, S., Guo, Y. C., Tan, Y. Y., Mao, H. T., Cao, Y., & Chen, Y. E. (2021). Highly efficient and sustainable removal of Cr(VI) in aqueous solutions by photosynthetic bacteria supplemented with phosphor salts. Chemosphere, 283, 131031.

Suganthi, V., Mahalakshmi, M., & Balasubramanian, B. (2013). Development of hybrid membrane bioreactor for tannery effluent treatment. Desalination, 309, 231-236.

Sultan, S., & Hasnain, S. (2007). Reduction of toxic hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* strain SDCr-5 stimulated by heavy metals. Bioresource technology, 98(2), 340-344.

Suresh, G., Balasubramanian, B., Ravichandran, N., Ramesh, B., Kamyab, H., Velmurugan, P., & Ravi, A. V. (2021). Bioremediation of hexavalent chromium-contaminated wastewater by *Bacillus thuringiensis* and *Staphylococcus capitis* isolated from tannery sediment. Biomass Conversion and Biorefinery, 11(2), 383-391.

Suthantharajan, R., Ravindranath, E., Chits, K., Umamaheswari, B., Ramesh, T., & Rajamam, S. (2004). Membrane application for recovery and reuse of water from treated tannery wastewater. Desalination, 164(2), 151-156.

T

Tadesse, I., Green, F. B., & Puhakka, J. A. (2004). Seasonal and diurnal variations of temperature, pH and dissolved oxygen in advanced integrated wastewater pond system treating tannery effluent. Water research, 38(3), 645-654.

Tadesse, A., Eshetu, L., Andualem, M., & Seyoum, L. (2016). Performance of pilot scale anaerobic-SBR system integrated with constructed wetlands for the treatment of tannery wastewater. Environmental Processes, 3(4), 815-827.

Rao, T. H. S., Papathoti, N. K., Gundeboina, R., Mohamed, Y. K., Mudhole, G. R., & Bee, H. (2017). Hexavalent chromium reduction from pollutant samples by *achromobacter xylosoxidans* SHB 204 and its kinetics study. Indian journal of microbiology, 57(3), 292-298.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular biology and evolution, 38(7), 3022-3027.

Tan, H., Wang, C., Zeng, G., Luo, Y., Li, H., & Xu, H. (2020). Bioreduction and biosorption of Cr(VI) by a novel *Bacillus* sp. CRB-B1 strain. Journal of hazardous materials, 386, 121628.

Tang, C. Y., Fu, Q. S., Criddle, C. S., & Leckie, J. O. (2007). Effect of flux (transmembrane pressure) and membrane properties on fouling and rejection of reverse osmosis and nanofiltration membranes treating perfluorooctane sulfonate containing wastewater. Environmental science & technology, 41(6), 2008-2014.

Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. International Journal of Chemical Engineering, 2011.

Tank, N., & Saraf, M. (2010). Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. Journal of Plant Interactions, 5(1), 51-58.

Tanrikulu, A. C., Abakay, A., Evliyaoglu, O., & Palanci, Y. (2011). Coenzyme Q10, copper, zinc, and lipid peroxidation levels in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Biological Trace Element Research, 143(2), 659-667.

Tebo, B. M., & Obraztsova, A. Y. (1998). Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. FEMS microbiology letters, 162(1), 193-199.

Thacker, U., & Madamwar, D. (2005). Reduction of toxic chromium and partial localization of chromium reductase activity in bacterial isolate DM1. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(6), 891-899.

Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., & Madamwar, D. (2006). Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. Process Biochemistry, 41(6), 1332-1337.

Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., & Madamwar, D. (2007). Reduction of chromate by cell-free extract of *Brucella* sp. isolated from Cr(VI) contaminated sites. Bioresource technology 98(8), 1541-1547.

Tharannum, S., Krishnamurthy, V., & Mahmood, R. (2012). Characterization of chromium remediating bacterium *Bacillus subtilis* isolated from electroplating effluent. Int J Engin Res Appl (IJERA), 2, 961-966.

Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., & Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. Journal of Environmental Management, 146, 383-399.

Thompson, J. E., Legge, R. L., & Barber, R. F. (1987). The role of free radicals in senescence and wounding. New Phytologist, 105(3), 317-344.

Tirry, N., Joutey, N. T., Sayel, H., Kouchou, A., Bahafid, W., Asri, M., & El Ghachtouli, N. (2018). Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: prospects in phytoremediation. Journal of genetic engineering and biotechnology, 16(2), 613-619.

Trindade, P. V. O., Sobral, L. G., Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F., Lemos, J. L. S., Millioli, V. S., & Soriano, A. U. (2002). Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil. In 9th international Petroleum Environmental Conference, New Mexico, USA.

Trippi, V. S. (1990). Oxidative stress and senescence in oat leaves. In Plant Aging (pp. 231-237). Springer, Boston, MA.

Tsuneda, S., Ohno, T., Soejima, K., & Hirata, A. (2006). Simultaneous nitrogen and phosphorus removal using denitrifying phosphate-accumulating organisms in a sequencing batch reactor. Biochemical Engineering Journal, 27(3), 191-196.

Tunali, S., Çabuk, A., & Akar, T. (2006). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. Chemical Engineering Journal, 115(3), 203-211.

Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation, 22(2), 231-241.

Tziritis, E., Kelepertzis, E., Korres, G., Perivolaris, D., & Repani, S. (2012). Hexavalent chromium contamination in groundwaters of Thiva basin, central Greece. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 89(5), 1073-1077.

V

Van Assche, F., & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant, Cell & Environment, 13(3), 195-206.

Varadhan, S. L., & Mohan, S. (2017). Selection and use of efficient bacterial strains for chromium biosorption in tannery effluent. Int. J. Recent Sci. Res, 8(3), 16230-16233.

Varadharajan, C., Han, R., Beller, H. R., Yang, L., Marcus, M. A., Michel, M., & Nico, P. S. (2015). Characterization of Chromium Bioremediation Products in Flow-Through Column Sediments Using Micro–X-ray Fluorescence and X-ray Absorption Spectroscopy. Journal of environmental quality, 44(3), 729-738.

Verma, T., Garg, S. K., & Ramteke, P. W. (2009). Genetic correlation between chromium resistance and reduction in *Bacillus brevis* isolated from tannery effluent. Journal of applied microbiology, 107(5), 1425-1432.

Verma, A., Dua, R., Singh, A., & Bishnoi, N. R. (2015). Biogenic sulfides for sequestration of Cr(VI), COD and sulfate from synthetic wastewater. Water Science, 29(1), 19-25.

Viamajala, S., Smith, W. A., Sani, R. K., Apel, W. A., Petersen, J. N., Neal, A. L., & Peyton, B. M. (2007). Isolation and characterization of Cr(VI) reducing *Cellulomonas* spp. from subsurface soils: Implications for long-term chromate reduction. Bioresource Technology, 98(3), 612-622.

Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. Pure and applied chemistry, 73(7), 1163-1172.

Viera, M., Curutchet, G., & Donati, E. (2003). A combined bacterial process for the reduction and immobilization of chromium. International biodeterioration & biodegradation, 52(1), 31-34.

Vijayaraj, A. S., Mohandass, C., & Joshi, D. (2019). Microremediation of tannery wastewater by siderophore producing marine bacteria. Environmental technology.

Voet, E. V. D., Guinée, J. B., & de Haes, H. A. U. (2000). Heavy Metals: A Problem Solved? Methods and Models to Evaluate Policy Strategies for Heavy Metals (Environment and Policy, Vol. 22).

Volesky, B. (1990). Biosorption and biosorbents. In: Volesky, B. (Ed.), Biosorption of Heavy Metals. CRC Press Florida, USA, Pp. 3e82.

Vora, J. U., & Modi, H. A. (2013). Bacterial diversity of soil samples of saline sites in Kharaghodha (Tehsil-Patdi, District-Surendranagar), Gujarat. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 3(3), 102-106.

W

Wang, P. C., Toda, K., Ohtake, H., Kusaka, I., & Yabe, I. (1991). Membrane-bound respiratory system of *Enterobacter cloacae* strain HO1 grown anaerobically with chromate. FEMS microbiology letters, 78(1), 11-15.

Wang, Y. T., & Shen, H. (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 14(2), 159-163.

Wang, Y. T. (2000). Microbial reduction of chromate. Environmental Microbe-Metal Interactions, 225-235.

Wani, P. A., Hussaini, N. A., Garba, S. H., Wahid, S., Damilola, F. K., Adeola, A. A., & Wasiu, I. A. (2018a). Prospective of chromium (VI) reduction under in vitro and in vivo conditions and stimulation of antioxidant defense of Cowpea under the exposure of Cr(VI). Applied Soil Ecology, 132, 187-193.

Wani, P. A., Sunday, O. O., Kehinde, A. M., Oluwaseyi, L. A., Wasiu, I. A., & Wahid, S. (2018b). Antioxidants and chromium reductases by *Penibacillus* species enhance the growth of soybean under chromium stress. International Journal of Environmental Science and Technology, 15(7), 1531-1542.

Wani, P. A., Wahid, S., Khan, M. S. A., Rafi, N., & Wahid, N. (2019). Investigation of the role of chromium reductase for Cr(VI) reduction by *Pseudomonas* species isolated from Cr(VI) contaminated effluent. Biotechnology Research and Innovation, 3(1), 38-46.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of bacteriology, 173(2), 697-703.

Wielinga, B., Mizuba, M. M., Hansel, C. M., & Fendorf, S. (2001). Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. Environmental science & technology, 35(3), 522-527.

Wierzba, S., & Latała, A. (2010). Biosorption lead (II) and nikel (II) from an aqueous solution by bacterial biomass. Polish Journal of Chemical Technology, 12(3), 72-78.

Wogu, M. D., & Okaka, C. E. (2011). Pollution studies on Nigerian rivers: heavy metals in surface water of warri river, Delta State. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 1(3), 7-12.

Wu, M., Li, Y., Li, J., Wang, Y., Xu, H., & Zhao, Y. (2019). Bioreduction of hexavalent chromium using a novel strain CRB-7 immobilized on multiple materials. Journal of hazardous materials, 368, 412-420.

X

Xia, X., Wu, S., Li, N., Wang, D., Zheng, S., & Wang, G. (2018). Novel bacterial selenite reductase CsrF responsible for Se(IV) and Cr(VI) reduction that produces nanoparticles in *Alishewanella* sp. WH16-1. Journal of hazardous materials, 342, 499-509.

Xu, L., Luo, M., Li, W., Wei, X., Xie, K., Liu, L., & Liu, H. (2011). Reduction of hexavalent chromium by *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 stimulated with external electron donors under alkaline conditions. Journal of Hazardous Materials, 185(2-3), 1169-1176.

Xu, H. Q., Zhang, J. E., Ouyang, Y., Lin, L., Quan, G. M., Zhao, B. L., & Yu, J. Y. (2015). Effects of simulated acid rain on microbial characteristics in a lateritic red soil. Environmental Science and Pollution Research, 22(22), 18260-18266.

Y

Yadav, P., Yadav, A., Srivastava, J. K., & Raj, A. (2021). Reduction of pollution load of tannery effluent by cell immobilization approach using *Ochrobactrum intermedium*. Journal of Water Process Engineering, 41, 102059.

Yadav, K. K., Gupta, N., Kumar, A., Reece, L. M., Singh, N., Rezania, S., & Khan, S. A. (2018). Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: a review on application and future prospects. Ecological engineering, 120, 274-298.

Yamamoto, K., Kato, J., Yano, T., & Ohtake, H. (1993). Kinetics and modeling of hexavalent chromium reduction in *Enterobacter cloacae*. Biotechnology and bioengineering, 41(1), 129-133.

Yang, J., He, M., & Wang, G. (2009). Removal of toxic chromate using free and immobilized Cr(VI)-reducing bacterial cells of *Intrasporangium* sp. Q5-1. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(9), 1579-1587.

Yang, J., Yu, M., & Chen, W. (2015). Adsorption of hexavalent chromium from aqueous solution by activated carbon prepared from longan seed: Kinetics, equilibrium and thermodynamics. Journal of industrial and engineering chemistry, 21, 414-422.

Yemm, E. W., & Willis, A. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical journal, 57(3), 508.

Yoshinaga, M., Ninomiya, H., Al Hossain, M. A., Sudo, M., Akhand, A. A., Ahsan, N., & Kato, M. (2018). A comprehensive study including monitoring, assessment of health effects and development of a remediation method for chromium pollution. Chemosphere, 201, 667-675.

Yuan, Y., Yang, S., Zhou, D., & Wu, F. (2016). A simple Cr(VI)–S(IV)–O_2 system for rapid and simultaneous reduction of Cr(VI) and oxidative degradation of organic pollutants. Journal of hazardous materials, 307, 294-301.

Z

Zahoor, A., & Rehman, A. (2009). Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. Journal of Environmental Sciences, 21(6), 814-820.

Zeng, Q., Hu, Y., Yang, Y., Hu, L., Zhong, H., & He, Z. (2019). Cell envelop is the key site for CrVI) reduction by *Oceanobacillus oncorhynchi* W4, a newly isolated Cr(VI) reducing bacterium. Journal of hazardous materials, 368, 149-155.

Zereen, A., Wahid, A., Khan, Z. U. D., & Sardar, A. A. (2013). Effect of tannery wastewater on the growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Bangladesh Journal of Botany, 42(2), 279-285.

Zhang, K., & Li, F. (2011). Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium *Serratia* sp. Cr-10 from a chromate-contaminated site. Applied microbiology and biotechnology, 90(3), 1163-1169.

Zhang, X., Wu, W., Virgo, N., Zou, L., Liu, P., & Li, X. (2014). Global transcriptome analysis of hexavalent chromium stress responses in *Staphylococcus aureus* LZ-01. Ecotoxicology, 23(8), 1534-1545.

Zhou, W., Yin, B. C., & Ye, B. C. (2017a). Highly sensitive surface-enhanced Raman scattering detection of hexavalent chromium based on hollow sea urchin-like TiO_2 Ag nanoparticle substrate. Biosensors and Bioelectronics, 87, 187-194.

Zhou, S., Dong, L., Deng, P., Jia, Y., Bai, Q., Gao, J., & Xiao, H. (2017b). Reducing capacity and enzyme activity of chromate reductase in a ChrT-engineered strain. Experimental and Therapeutic Medicine, 14(3), 2361-2366.

Zhu, F., Qu, L., Hong, X., & Sun, X. (2011). Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of Yellow Sea of China. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011.

Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. Science of the Total Environment, 612, 522-537.

Zhu, Y., Yan, J., Xia, L., Zhang, X., & Luo, L. (2019). Mechanisms of Cr(VI) reduction by *Bacillus* sp. CRB-1, a novel Crf(VI)-reducing bacterium isolated from tannery activated sludge. Ecotoxicology and Environmental Safety, 186, 109792.

Annexe

CRB-1 : *Brachybacterium paraconglomeratum* strain ER41

```
  1 acctgccctc cacttcggga taacctcggg aaatcgtggc taataccgga tatgagcact
 61 catcgcatgg tgggtgttgg aaagatttat cggtgggga tggactcgcg gcctatcagt
121 ttgttggtga ggtgatggct caccaagacg atgacgggta gccggcctga gagggcgacc
181 ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctcctacggg aggcagcagt ggggaatatt
241 gcacaatggg cgaaagcctg atgcagcgac gccgcgtggg ggatgacggc cttcgggttg
301 taaacccttt ttagtaggga agaagcgaga gtgacggtac ctgcagaaga agcgccggct
361 aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggcgcaag cgttgtccgg aattattggg
421 cgtaaagagc ttgtaggtgg cttgtcgcgt ctgccgtgaa aacccgaggc tcaacctcgg
481 gcgtgcggtg ggtacgggca ggctagagtg tggtagggga gactggaact cctggtgtag
541 cggtgaaatg cgcagatatc aggaagaaca ccgatggcga aaggcaggtc tctgggccat
601 tactgacact gagaagcgaa agcatgggta gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca
661 tgccgtaaac
```

CRB-2 : *Staphylococcus aureus* strain CC1956

```
  1 cggacgagaa gcttgcttct ctgatgttag cggcggacgg gtgagtaaca cgtggataac
 61 ctacctataa gactgggata acttcgggaa accggagcta ataccggata atattttgaa
121 ccgcatggtt caaaagtgaa agacggtctt gctgtcactt atagatggat ccgcgctgca
181 ttagctagtt ggtaaggtaa cggcttacca aggcaacgat gcatagccga cctgagaggg
241 tgatcggcca cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggca gcagtaggga
301 atcttccgca atgggcgaaa gcctgacgga gcaacgccgc gtgagtgatg aaggtcttcg
361 gatcgtaaaa ctctgttatt agggaagaac atatgtgtaa gtaactgtgc acatcttgac
421 ggtacctaat cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg
481 gcaagcgtta tccggaatta ttgggcgtaa agcgcgcgta ggcggttttt taagtctgat
541 gtgaaagccc acggctcaac cgtggagggt cattggaaac tggaaaactt gagtgcagaa
601 gaggaaagtg gaattccatg tgtagcggtg aaatgcgcag agatatggag gaacaccagt
661 ggcgaaggcg actttctggt ctgtaactga cgctgatgtg
```

CRB-3 : *Bacillus safensis* strain CCMM B629

```
  1 cgtaaacgat gagtgctaag tgttaggggg tttccgcccc ttagtgctgc agctaacgca
 61 ttaagcactc cgcctgggag tacggtcgca agactgaaac tcaaaggaat tgacgggggc
121 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc
181 ttgacatcct ctgacaaccc tagagatagg gctttccctt cggggacaga gtgacaggtg
241 gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca
301 acccttgatt ttagttgcca gcattcagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa
361 ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccccc tatgacctgg gctacacacg
421 tgctacaatg gacagaacaa agggctgcaa gaccgcaagg tttagccaat cccataaatc
481 tgttctcagt tcggatcgca gtttgcaact cgactgcgtg aagctggaat cgctagtaat
541 cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac
601 cacgagagtt tgcaacaccc gaagtcggtg
```

CRB-4 : *Bacillus pumilus* strain ATCC 7061

```
  1 cttgctcccg gatgttagcg gcggacgggt gagtaacacg tgggtaacct gcctgtaaga
 61 ctgggataac tccgggaaac cggagctaat accggatagt tccttgaacc gcatggttca
121 aggatgaaag acggtttcgg ctgtcactta cagatggacc cgcggcgcat tagctagttg
181 gtggggtaat ggctcaccaa ggcgacgatg cgtagccgac ctgagagggt gatcggccac
241 actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccgcaa
301 tggacgaaag tctgacggag caacgccgcg tgagtgatga aggttttcgg atcgtaaagc
361 tctgttgtta gggaagaaca agtgcgagag taactgctcg caccttgacg gtacctaacc
421 agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttgt
481 ccggaattat tgggcgtaaa gggctcgcag gcggtttctt aagtctgatg tgaaagcccc
541 cggctcaacc ggggagggtc attggaaact gggaaacttg agtgcagaag aggagagtgg
601 aattccacgt gtagcggtga aatgcgtaga gatgtggagg aacaccagtg gcgaaggcga
661 ctctctggtc
```

CRB-5 : *Staphylococcus succinus* subsp. *succinus* strain AMG-D1

```
  1 gtcgagcgac ggataggagc ttgctccttt gagttagcgg cggacgggtg agtaacacgt
 61 gggtaaccta cctataagac tggaataact tcgggaaacc ggagctaatg ccggataaca
121 tatagaaccg catggttcta tagtgaaaga tggttttgct atcacttata gatggacccg
181 cgccgtatta gctagttggt aaggtaatgg cttaccaagg cgacgatacg tagccgacct
241 gagagggtga tcggccacac tggaactgag acacggtcca gactcctacg ggaggcagca
301 gtagggaatc ttccgcaatg ggcgaaagcc tgacggagca acgccgcgtg agtgatgaag
361 gttttcggat cgtaaaactc tgttattagg gaagaacaaa tgcgtaagta actgtgcgca
421 tcttgacggt acctaatcag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac
481 gtaggtggca agcgttatcc ggaattattg ggcgtaaagc gcgcgtaggc ggtttcttaa
541 gtctgatgtg aaagcccacg gctcaaccgt ggagggtcat tggaaactgg gaaacttgag
601 tgcagaagag gaaagtggaa ttccatgtgt agcggtgaaa tgcgcagaga tatggaggac
661 accagtgcga
```

CRB-6 : *Staphylococcus gallinarum* strain VIII1

```
  1 agtcgagcga cagataggag cttgctcctt tgacgttagc ggcggacggg tgagtaacac
 61 gtgggtaacc tacctataag actggaataa ctccgggaaa ccggggctaa tgccggataa
121 catatagaac cgcatggttc tatagtgaaa gatggttttg ctatcactta tagatggacc
181 cgcgccgtat tagctagttg gtaaggtaat ggcttaccaa ggcgacgata cgtagccgac
241 ctgagagggt gatcggccac actggaactg agacacggtc cagactccta cgggaggcag
301 cagtagggaa tcttccgcaa tgggcgaaag cctgacggag caacgccgcg tgagtgatga
361 agggtttcgg ctcgtaaaac tctgttatta gggaagaaca tatgtgtaag taactgtgca
421 catcttgacg gtacctaatc agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat
481 acgtaggtgg caagcgttat ccggaattat tgggcgtaaa gcgcgcgtag gcggtttctt
541 aagtctgatg tgaaagccca cggctcaacc gtggagggtc attggaaact gggaaacttg
601 agtgcagaag aggaaagtgg aattccatgt gtagcggtga aatgcgcaga gatatggagg
661 aacaccagtg gcgaaggcga ctttctggtc tgtaactgac gctgatgtgc gaaagcgtgg
721 ggatcaaaca
```

Résumé de la thèse

La dépollution des effluents industriels contaminés par le Cr (VI) en utilisant des procédés efficaces et économiques est très importante pour préserver l'environnement et par conséquent pour protéger la santé humaine. Aussi, et dans les conditions actuelles de sécheresse, il est recommandé de traiter les eaux polluées pour pouvoir les réutiliser. Les méthodes physico-chimiques de traitement et de dépollution sont largement utilisées, mais malgré leur efficacité elles ont montrés leurs limites en termes de coût et du non-respect de l'environnement en générant des sous-produits. Les travaux de recherche sur la bioremédiation des effluents contaminés par le Cr(VI) ont fait l'objet de plusieurs études approfondies pendant de nombreuses années.

Le présent travail de recherche vise à utiliser des bactéries métallo-résistantes dans la déchromatation des effluents de tanneries. Pour cela, six bactéries résistantes au chrome et à d'autres métaux lourds ont été isolées à partir du sol de mines de plomb, de cuivre et de fer abandonnées dans la région de Taza, au Maroc. Ces bactéries ont été identifiées par des méthodes moléculaires (PCR et séquençage) autant que : **i**) *Brachybacterium paraconglomeratum* ER41 (**CRB-1**), **ii**) *Staphylococcus aureus* CC1956 (**CRB-2**), **iii**) *Bacillus safensis* strain CCMM B29 (**CRB-3**), **vi**) *Bacillus pumilus* strain ATCC 7061 (**CRB-4**), **v**) *Staphylococcus succinus* subsp. *Succinus* strain AMG-D1 (**CRB-5**) et **vi**) *Staphylococcus gallinarum* strain VIII1 (**CRB-6**). Ces six bactéries ont montré leur efficacité à réduire rapidement et complètement le Cr(VI) à des concentrations élevées, dans des conditions optimales de pH (7 à 9) et de température (30 °C à 35 °C). La présence du cuivre et du Fer améliore considérablement l'efficacité de réduction du Cr(VI) par ces CRB. De plus, elles ont démontré leur aptitude à réduire efficacement le Cr(VI) en utilisant du glucose et du glycérol en tant que sources de carbone dans un milieu minimal. Aussi, la réduction des contaminations répétées du Cr(VI) par des cellules immobilisées, dans des billes d'alginate, et des cellules en suspension a montré leur efficacité en matière de détoxification du Cr(VI), que ce soit dans un environnement modifié ou non, et sur plusieurs cycles. L'utilisation de ces six bactéries en consortium a montré leur efficacité dans le traitement des effluents de tanneries contaminés par le Cr(VI), avec un taux d'abattement considérable pour les divers polluants : une réduction de 79% de la Demande Chimique en Oxygène (DCO), une réduction de 88% des ions nitrate (NO_3^-), une réduction de 93% des ions sulfates (SO_4^{2-}), une réduction de 85% de l'azote total Kjeldahl (NTK) et une élimination totale du Cr(VI) à hauteur de 100%.

Les études des isothermes d'adsorption ont révélé que le modèle de Langmuir fournissait une description satisfaisante du processus d'adsorption du Cr(VI). En outre, les analyses réalisées à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB), de la spectroscopie dispersive d'énergie des rayons X (EDX) et de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ont confirmé à la fois la résistance considérable et la capacité de nos cellules bactériennes à adsorber et réduire efficacement le Cr(VI). Dans le but de cerner et de localiser les compartiments cellulaires impliqués dans le mécanisme de réduction du Cr(VI), les expériences menées sur les cellules au repos, perméabilisées et des fractions subcellulaires ont révélé que l'élimination du Cr(VI) était principalement le résultat d'une réduction enzymatique, impliquant des protéines localisées à la fois dans la membrane cellulaire et dans la fraction cytosolique. De plus, une électrophorèse sur gel SDS-PAGE a indiqué la présence d'une protéine d'un poids moléculaire d'environ 30 à 35 kDa, suggérant un rôle potentiel de cette protéine dans le processus de réduction du chrome.

En fin, les effluents déchromatés par ces bactéries ont été utilisés dans l'irrigation. Pour cela, un test d'hypersensibilité a été effectué sur les feuilles de tabac. Les résultats obtenus ont montré l'absence d'effets phytopathogènes indésirables de ces bactéries sur ces plantes. Ensuite, des essais d'irrigation des plants de tomates ont été réalisés sous serre, durant les mois d'Avril et de Mai. Ces essais ont non seulement confirmé l'efficacité du traitement biologique des effluents de tanneries, mais ont également mis en évidence la capacité de nos bactéries à stimuler la croissance des plants de tomates. Les plants irrigués avec les effluents traités ont montré une accumulation significative de pigments chlorophylliens, caractérisée par une fluorescence élevée. De plus, elles ont présenté une coloration verte plus intense, avec un feuillage plus abondant et une floraison plus prolifique par rapport à ceux irrigués avec les effluents bruts. Cependant, les concentrations d'osmolytes tels que les protéines, les sucres et la proline étaient modérément élevées en raison de la forte présence des ions de sodium dans les effluents des tanneries.

Cette étude montre la capacité de nos bactéries de dépolluer les eaux usées contaminées par le Cr(VI). Ceci ouvre des perspectives très encourageantes pour les utiliser, en consortiums, dans les systèmes de traitement des effluents de tanneries.

Mots clés : Bioremédiation, Bactéries, Immobilisées, Perméabilisées, Consortium, Fractions subcellulaires, Réduction enzymatique, Effluents de tanneries, Irrigation.