

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

Faculté de Génie Mécanique et de Génie des Procédés
Département de Génie de l'Environnement et Génie Pharmaceutique



THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Présentée pour l'obtention du **grade** de **DOCTEUR**

En : Génie des Procédés

Spécialité : *Technologie Pharmaceutique*

Par : **KAMECHE Karima**

Sujet

**Biodégradation du colorant diazoïque Bleu d'Evans par
quatre souches de *Streptomyces* isolées des différents sols
d'Algérie**

Soutenue publiquement, le 16/05/2024 devant le jury composé de :

Mme Farida KAOUAH	Professeur à l'USTHB	Présidente
M. Hamid AIT AMAR	Professeur à l'USTHB	Directeur de thèse
Mme. Kenza BENSOK	Professeur à l'USTHB	Co-Directrice de thèse
Mme Nadia BOUDRIES	Professeur à l'ENS Kouba	Examinatrice
Mme Hassiba ZEMMOURI	Professeur à l'ESSA Alger	Examinatrice
Mme Fatiha FERRAG	MC-A à l'UMM Tizi-ouzou	Examinatrice
M. Saïd AMRANI	Professeur à l'USTHB	Invité

Résumé

Les rejets provenant du processus de teinture sont devenus une cause majeure de pollution des ressources d'eau en raison de leurs caractéristiques xénobiotiques et de leur nocivité pour l'environnement et les êtres humains. Pour remédier à ce problème, nous avons opté pour une approche de traitement biologique visant à éliminer les colorants indésirables et leur toxicité.

Dans un premier temps, nous avons réussi à isoler quatre souches distinctes de *Streptomyces*, provenant de différents types de sols, et présentant un potentiel significatif de dégradation du colorant azoïque Blue d'Evans. Ces souches ont été identifiées comme appartenant à *Streptomyces maritimus*, *S. mutabilis* et *S. ardesiacus*.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une série d'expériences visant à étudier les paramètres qui influencent la dégradation du colorant Blue d'Evans. Ces paramètres comprenant : le temps d'incubation, la température, le pH, la source de carbone, la concentration en colorant, la concentration en sel et la présence de certains ions métalliques.

Enfin, nous avons examiné la biodégradation du Bleu d'Evans par HPLC et également étudié la capacité des *Streptomyces* identifiés à dégrader d'autres colorants azoïques tels que le Noir amido 10B, le Noir de chlorazol E, le Rouge Congo, le Rouge de méthyle, la Nigrosine et le Sudan II.

Mots clé : Xénobiotiques, Toxicité, *Streptomyces*, Colorants azoïque, Biodégradation

Remerciements

Les travaux de recherche qui font l'objet de cette thèse ont été réalisés, d'une part au sein du laboratoire de Biologie de Sol, Faculté de Biologie (USTHB), sous la direction du Professeur Saïd AMRANI, et d'autre part, au niveau du laboratoire des Sciences et des Technologies Environnementales (USTHB), sous la direction du Professeur Hamid AIT AMAR.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Hamid AIT AMAR, Professeur à l'USTHB pour la confiance que m'a accordé en me proposant ce sujet, avec qui j'ai eu le grand plaisir de travailler tout au long de la réalisation de cette thèse. Sa disponibilité, ses compétences scientifiques, ses orientations et remarques pointues et sa grande qualité humaine, m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie particulièrement Monsieur Saïd AMRANI, Professeur à l'USTHB, pour avoir codirigé cette thèse. Son aide précieuse, ses conseils avisés m'ont permis d'améliorer mes connaissances en microbiologie, ses critiques pertinentes et son soutien permanent m'ont poussé à ne jamais s'affaiblir et de poursuivre toujours plus loin mes travaux.

Je remercie vivement Mme Farida KAOUAH professeur à l'USTHB pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant de juger et de présider le jury de cette thèse de doctorat.

Je souhaite également remercier Mme Nadia BOUDRIES, Professeur à l'ENS Kouba, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie Mme Hassiba ZEMMOURI, Professeur à l'ESSA Alger, pour avoir consacré de son temps pour examiner mon travail et faire partie du jury de thèse.

Je remercie également Mme Fatiha FERRAG, MC-A à l'UMM Tizi-ouzou d'avoir accepté de participer au jury et d'examiner cette thèse.

Je voudrais exprimer ma gratitude à ma famille. A mon merveilleux père décédé "Allah yerahmou" et qui là où il est, continue de veiller sur moi. A ma très chère maman, à celle qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour les sacrifices que tu as fait pour que tes enfants grandissent et prospèrent. Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de l'âge, de la santé, de la vie, au bien-être de tes enfants. Enfin ! Merci tout simplement d'être... ma mère, que Dieu te garde. Merci aussi à mes frères et sœurs qui

ont été une source d'inspiration et de motivation pour moi. Ils m'ont toujours encouragé, soutenus, et sans leurs aides ce travail n'aurait jamais pu voir le jour.

Enfin, je remercie mes amis et mes collègues, qui ont toujours été là pour moi. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements ont été d'une grande aide.

SOMMAIRE

Résumé

Remerciement

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1. Généralité sur les colorants4

I.1.1. Définition4

I.1.2. Classification des colorants.....6

I.1.2.1. Les colorants azoïques6

I.1.2.2. Les colorants anthraquinoniques7

I.1.2.3. Les colorants triphénylméthanes et leurs dérivés hétérocycliques.....7

I.1.2.4. Les colorants indigoïdes7

I.1.2.5. Les colorants xanthènes8

I.1.2.6. Les colorants phtalocyanines8

I.1.2.7. Les colorants nitrés et nitrosés8

I.1.3. Application industrielle des colorants9

I.1.3.1. L'industrie agro-alimentaire9

I.1.3.2. L'industrie pharmaceutique9

I.1.3.3. L'industrie textile9

I.1.4. Toxicité des colorants10

I.1.5. Impacts environnementaux des colorants11

I.1.5.1. Effet à court terme11

I.1.5.2. Effet à long terme12

I.1.6. Normes de rejet des colorants12

I.2. Procédés de traitement des eaux usées contenant des colorants13

I.2.1. Procédés physiques.....14

I.2.1.1. Procédés membranaires14

I.2.1.2. Procédé physicochimique de coagulation-floculation.....14

I.2.1.3. Procédés d'adsorption.....	15
I.2.2. Procédés chimiques	15
I.2.3. Procédés biologiques	16
I.2.4. Résumé comparatif des procédés et analyse critique	16
I.3. Les actinobactéries.....	17
I.3.1. Généralités	17
I.3.2. Morphologie et caractéristiques des actinobactéries	17
I.3.2.1. Mécylium de substrat.....	20
I.3.2.2. Mécylium aérien	20
I.3.2.3. Chaîne de spores.....	20
I.3.3. Écologie et répartition des actinobactéries dans la nature	21
I.3.4. Cycle de développement des actinobactéries.....	22
I.3.5. Classification et taxonomie des actinobactéries.....	23
I.3.5.1. Organisation systématiques des actinobactéries	23
I.3.5.2. Critères d'identification des actinobactéries	24
I.3.6. Application des actinobactéries en biotechnologie	25
I.4. Biodégradation des colorants par les actinobactéries	28
I.4.1. Mécanisme de dégradation des colorants azoïques.....	29
I.4.1.1. Le processus biosorption/accumulation intracellulaire	29
I.4.1.2. Dégradation réductrice des colorants azoïques	29
I.4.1.3. Dégradation oxydative des colorants azoïques	30
I.4.2. Les facteurs affectant la biodégradation des colorants azoïques chez les actinobactéries.....	31
I.5. Conclusion	33
Références	35

Chapitre II: Matériel et méthodes

II.1. Objectifs.....	44
II.2. Réactifs utilisés	44
II.2.1. Réactifs chimiques	44
II.2.2. Les colorants.....	45
II.2.2.1. Structures et caractéristiques physico-chimiques des colorants	45
II.2.2.2. Préparation des colorants.....	47
II.3. Matériel biologiques	47
II.3.1. Isolement et sélection des souches d'intérêt.....	47
II.3.1.1. Origine des souches.....	47

II.3.1.2. Préparation des suspensions mères	49
II.3.1.3. Techniques d'ensemencement et d'isolement des souches	49
II.3.2. Repiquage, purification et conservation des souches	49
II.3.3. Identification et caractérisation des isolats	49
II.4. Méthodes d'analyse	50
II.4.1. L'analyse par spectrophotométrie UV-Visible	50
II.4.2. Etude des paramètres influençant la dégradation du Bleu d'Evans	51
II.4.2.1. Effet de la vitesse d'agitation.....	51
II.4.2.2. Effet de la température	51
II.4.2.3. Effet du pH	52
II.4.2.4. Effet de la concentration initiale du colorant.....	52
II.4.2.5. Effet des sources de carbone.....	52
II.4.2.6. Effet de la salinité du milieu	53
II.4.2.7. Effets des ions métalliques	53
II.4.3. Analyse du colorant par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ..	54
II.4.4. Test de biodégradation des différents colorants azoïques	54
II.5. Conclusion	55
Références	56

Chapitre III: Isolement et identification des souches

III.1. Introduction.....	57
III.2. Isolement des souches	57
III.3. Caractérisation des souches isolées.....	57
III.4. Identification des actinobactéries	60
III.5. Conclusion	62
Références	63

Chapitre IV: Facteurs influençant la dégradation des colorants azoïques

IV.1. Introduction	64
VI.2. Etude de la décoloration du Bleu d'Evans par les actinobactéries identifiés	64
VI.3. Optimisation des paramètres influençant la dégradation du Bleu d'Evans	65
VI.3.1. Influence de la vitesse d'agitation sur l'efficacité de la décoloration	65
VI.3.2. Influence de la température sur l'efficacité de la décoloration	67
VI.3.3. Influence du pH initial sur l'efficacité de la décoloration	69
VI.3.4. Influence de la concentration initial du colorant sur l'efficacité de la décoloration.....	71
VI.3.5. Influence de la source du carbone sur l'efficacité de la décoloration	74

VI.3.6. Influence de la concentration en sel sur l'efficacité de la décoloration	76
VI.3.7. Influence des ions métalliques sur l'efficacité de la décoloration	78
VI.4. Conclusion.....	80
Références	81
Chapitre V: Dégradation des colorants azoïques par <i>Streptomyces</i>	
V.1. Introduction.....	84
V.2. Étude de la biodégradation du Bleu d'Evans par HPLC	84
V.3. Utilisation des <i>Streptomyces</i> pour la dégradation des différents colorants azoïques	88
V.4. Conclusion	90
Références	91
IV. Conclusion générale	92
Annexe	94

Liste des figures

Figure 1 : Structure du rouge para.....	7
Figure 2 : Structure d'anthraquinone	7
Figure 3 : Structure de triphénylméthane	7
Figure 4 : Structure du carmin d'indigo.....	8
Figure 5 : Structure du xanthène	8
Figure 6 : Structure de la phtalocyanine.....	8
Figure 7 : Structure du colorant Nitrosé.....	9
Figure 8 : Structures chimiques de quelques amines aromatiques toxiques.....	11
Figure 9 : Images au microscope électronique de : (a) coques de <i>Micrococcus luteus</i> , (b) bâtonnets de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , (c) hyphes ramifiés de <i>Micromonospora schwarzwaldensis</i> , (d) mycéliums fragmentés de <i>Nocardia</i> <i>asteroides</i> et (e) hyphes aériens ramifiés de <i>Streptomyces mangrovisoli</i>	18
Figure 10 : Classes morphologiques de <i>Streptomyces olindensis</i> cultivées en cultures liquide	19
Figure 11 : Une coupe transversale d'une colonie d'actinobactérie poussant sur milieu gélosé	19
Figure 12 : Morphologie des longues chaînes de spores des espèces de <i>Streptomyces</i> : (a) <i>Streptomyces plumbiresistens</i> , (b) <i>Streptomyces vinaceus</i> , (c) <i>Streptomyces</i> <i>hygroscopique</i> , et (d) <i>Streptomyces verticillus</i>	21
Figure 13 : Représentation schématique du cycle de développement des actinobactéries.....	23
Figure 14 : Taxonomie des actinobactéries d'après le Manuel de Bactériologie Systématique de Bergey	24
Figure 15 : Structures chimiques des colorants étudiés	46
Figure 16 : Aspect macroscopique des souches sur milieu de Bleu d'Evans (a) et sur milieu TSA (b)	58
Figure 17 : Observation microscopique des souches après coloration de Gram à Gx100	59
Figure 18 : Pourcentage de décoloration du Bleu d'Evans après 7 jours d'incubation	60

Figure 19 : Arbre simplifié montrant la position phylogénétique des quatre souches isolées de <i>Streptomyces</i> : A011, A013, B061 et S1T049.....	61
Figure 20 : Variation du taux de décoloration du BE en fonction du temps d'incubation, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	65
Figure 21 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces maritimus</i> A011 en fonction du temps et de la vitesse d'agitation, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et un pH = 7	66
Figure 22 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces</i> sp.A013 en fonction du temps et de la vitesse d'agitation, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et un pH = 7	66
Figure 23 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces mutabilis</i> B061 en fonction du temps et de la vitesse d'agitation, avec [BE] = 50 mg/L, T= 30 °C et un pH = 7	66
Figure 24 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces ardesiacus</i> S1T049 en fonction du temps et de la vitesse d'agitation, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30°C et un pH = 7	67
Figure 25 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces maritimus</i> A011 en fonction du temps et de la température, avec [BE] = 50 mg/L, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	68
Figure 26 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces</i> sp.A013 en fonction du temps et de la température, avec [BE] = 50 mg/L, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	68
Figure 27 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces mutabilis</i> B061 en fonction du temps et de la température, avec [BE] = 50 mg/L, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	69
Figure 28 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces ardesiacus</i> S1T049 en fonction du temps et de la température, avec [BE] = 50 mg/L, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	69
Figure 29 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces maritimus</i> A011 en fonction du temps et du pH, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	70
Figure 30 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces</i> sp.A013 en fonction du temps et du pH, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	70

Figure 31 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces mutabilis</i> B061 en fonction du temps et du pH, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	71
Figure 32 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces ardesiacus</i> S1T049 en fonction du temps et du pH, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30° et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	71
Figure 33 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces maritimus</i> A011 en fonction du temps et de la concentration initiale du BE pour T = 30 °C et pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	72
Figure 34 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces</i> sp.A013 en fonction du temps et de la concentration initiale du BE pour pH = 7 et T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	73
Figure 35 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces mutabilis</i> B061 en fonction du temps et de la concentration initiale du BE pour pH = 7 et T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	73
Figure 36 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces ardesiacus</i> S1T049 en fonction du temps et de la concentration initiale du BE pour pH = 7 et T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min.....	73
Figure 37 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces maritimus</i> A011 en fonction du temps et de la source du carbone, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	74
Figure 38 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces</i> sp.A013 en fonction du temps et de la source du carbone, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	75
Figure 39 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces mutabilis</i> B061 en fonction du temps et de la source du carbone, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	75
Figure 40 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces ardesiacus</i> S1T049 en fonction du temps et de la source du carbone, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	75
Figure 41 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces maritimus</i> A011 en fonction du temps et de concentration en NaCl, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	76

Figure 42 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces</i> sp.A013 en fonction du temps et de la concentration en NaCl, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	77
Figure 43 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces mutabilis</i> B061 en fonction du temps et de la concentration en NaCl, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	77
Figure 44 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces ardesiacus</i> S1T049 en fonction du temps et de la concentration en NaCl, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	77
Figure 45 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces maritimus</i> A011 en fonction du temps et des ions métalliques, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	78
Figure 46 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces</i> sp.A013 en fonction du temps et des ions métalliques, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	79
Figure 47 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces mutabilis</i> B061 en fonction du temps et des ions métalliques, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	79
Figure 48 : Pourcentage de décoloration du BE par <i>Streptomyces ardesiacus</i> S1T049 en fonction du temps et des ions métalliques, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min	79
Figure 49 : Chromatogrammes HPLC. (A) Colorant BE pur (échantillon témoin) ; (B) Colorant traité avec <i>Streptomyces mutabilis</i> B061 ; (C) Colorant traité avec <i>Streptomyces maritimus</i> A011 ; (D) Colorant traité avec <i>Streptomyces</i> sp.A013 ; (E) Colorant traité avec <i>Streptomyces ardesiacus</i> S1T049	86
Figure 50 : Voie proposée pour la biodégradation du Bleu d'Evans. Les composés entre crochets sont les intermédiaires postulés	87
Figure 51 : Evolution du rendement de la décoloration de (A) Noir de chlorazol E ; (B) Nigrosine ; (C) Noir amido 10B ; (D) Rouge Congo ; (E) Rouge de méthyle ; (F) Sudan II en fonction du temps, et en présence de <i>Streptomyces maritimus</i> A011, <i>Streptomyces</i> sp.A013, <i>Streptomyces mutabilis</i> B061, <i>Streptomyces ardesiacus</i> S1T049.....	89

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux groupes chromophores et auxochromes	5
Tableau 2 : Normes algériennes de rejets de l'industrie textile	13
Tableau 3 : Estimation des degrés de fixation des différents colorants aux fibres textiles.....	13
Tableau 4 : Répartitions des actinobactéries dans la nature	22
Tableau 5 : Principaux critères taxonomiques des actinobactéries.....	25
Tableau 6 : Exemples d'enzymes provenant d'actinobactéries.....	27
Tableau 7 : Biodégradation de quelques colorants synthétiques par les actinobactéries.....	28
Tableau 8 : Différents types de laccases présentes chez les espèces du genre <i>Streptomyces</i>	31
Tableau 9 : Réactifs chimiques utilisés	45
Tableau 10 : Caractéristiques physico-chimiques des molécules cibles.....	47
Tableau 11 : Les différents sols utilisés dans l'étude.....	48
Tableau 12 : Caractéristiques culturales des souches bactériennes sur milieu TSA après 72 h d'incubation	58

Liste des abréviations

A	Absorbance
A _i	Absorbance initiale
A _f	Absorbance finale
BE	Bleu d'Evans
C	Concentration
DBO	Demande biologique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
g	Gramme
h	Heures
L	Litre
MF	Microfiltration
mg	Milligrammes
min	Minutes
mL	Millilitres
mM	Milli-Moles
mol/L	Mole/Litres
NA	Noir amido 10B
NC	Noir de chlorazol E
NF	Nanofiltration
NI	Nigrosine
nm	Nanomètres
OI	Osmose inverse
RC	Rouge Congo
RM	Rouge de méthyle

sp	Espèce
spp	Plusieurs espèces
SUD	Sudan II
t	Temps d'incubation
T	Température d'incubation
tr/min	Tours/minutes
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UF	Ultrafiltration
UV	Ultra-violet
V	Volume
λ_{max}	Longueur d'onde maximale
μm	Micromètres
° C	Degré Celsius

Introduction générale

Introduction générale

Aujourd'hui, nos milieux aquatiques sont pollués par de nombreux déchets et molécules chimiques. Cette pollution de l'eau est due, essentiellement, aux rejets industriels non traités, et, parmi ces rejets polluants, les colorants synthétiques (**Shirazi et al., 2020**). Ces derniers sont largement utilisés dans divers domaines tels que les industries textiles, celles des matières plastiques, du caoutchouc, du papier, des cosmétiques et pharmaceutique (**Shindhal et al., 2021**).

La libération incontrôlée de ces composés dans l'environnement, même à très faible concentration, provoque de graves problèmes de santé chez l'homme (respiratoire, irritation de la peau, cancer, etc.) et de nuisances pour notre environnement, en raison de leur toxicité, leur persistance et leur structure complexe qui les rend plus stables (**Al-Tohamy et al., 2020**). Dans beaucoup de pays, la pollution de l'eau par ces colorants a pris une grande part des préoccupations environnementales, du fait que l'eau est une denrée de plus en plus rare et de moins en moins renouvelable. La plupart de ces rejets de colorants proviennent de l'industrie textile, qui est l'un des principaux consommateurs d'eau, avec environ 93 milliards de mètres cubes d'eau par an (**Chen et al., 2021**).

Une variété de colorants synthétiques est utilisée en industries textiles. Cependant, seule une classe des colorants azoïques prédomine au plan de l'application, celle-ci est estimée à environ 500000 tonnes/an et représente 60-70% de la production mondiale de matières colorantes (**Da Cruz Brambilla et al., 2019**). Les colorants azoïques sont caractérisés par la présence du groupe fonctionnel azo ($-N=N-$), reliant deux groupements alkyles ou aryles identiques ou non. Suivant le nombre des chromophores azo rencontrés dans la molécule, on distingue les monoazoïques, diazoïques, polyazoïques (**Louati et al., 2020**). Cette catégorie de colorants et surtout leurs dérivés aromatiques ont été identifiées comme cancérogènes et mutagènes et causent des effets néfastes à la vie aquatique (**Roy et al., 2018 ; Al-Tohamy et al., 2020**).

Plusieurs procédés physiques, chimiques et biologiques sont utilisés en vue de l'élimination des colorants tels que : l'adsorption, filtration membranaire, précipitation, coagulation, floculation et décantation, résine échangeuse d'ions, oxydation par l'oxygène, l'ozone (**Al-Tohamy et al., 2020**). Cependant, chacune de ces techniques a ses avantages et ses inconvénients.

Le procédé de traitement par voie biologique a fait l'objet de nombreux travaux. Il est considéré comme l'une des techniques la plus utilisée en vue de la dégradation ou l'élimination des colorants synthétiques sous l'action des micro-organismes (bactéries, actinobactéries, champignons, algues, levures). Ce procédé présente un grand nombre d'avantages, il est moins coûteux, moins polluant et plus efficace car plus spécifique (**Ali et al., 2021**).

Les actinobactéries se distinguent par leur capacité à dégrader les colorants, une caractéristique qui les rend particulièrement intéressantes pour la biorestauration. Ces microorganismes procaryotes possèdent un pourcentage élevé de guanine-cytosine, dépassant souvent 55%, ce qui les différencie des autres bactéries. Ils constituent une branche distincte sur le plan phylogénétique et se distinguent par une grande variété de formes, allant des cocci à la forme mycélienne parfaite (**Goodfellow, 2012**). Leur efficacité dans le traitement des eaux usées découle de leurs voies métaboliques diversifiées, qui leur permettent de s'adapter à une gamme étendue de conditions environnementales, y compris les environnements extrêmes. Des études ont également souligné leur capacité à survivre dans des conditions difficiles (**Lee et al., 2012 ; Mahajan et Balachandran, 2012**).

Cette étude a été entreprise dans le but d'isoler des micro-organismes capables de décolorer et / ou de dégrader divers colorants azoïques synthétiques. L'utilisation de bactéries isolées de différents échantillons de sols a été envisagée pour développer un procédé biologique efficace de traitement des effluents contaminés par des colorants.

Notre thèse est structurée en cinq grands chapitres. Le premier chapitre propose une revue de la littérature sur les colorants synthétiques, leurs classifications, les risques environnementaux associés et les méthodes de traitement, en mettant l'accent sur les procédés biologiques et la biodégradation des colorants azoïques par les actinobactéries. Le deuxième chapitre détaille les réactifs chimiques, le matériel biologique, les méthodes expérimentales de traitement et les techniques d'analyse utilisées. Le troisième chapitre aborde l'isolement des souches, leur caractérisation morphologique et leur identification. Le quatrième chapitre examine la décoloration du Bleu d'Evans par les actinobactéries identifiées, avec une optimisation des paramètres influençant le processus de dégradation. Le cinquième chapitre se concentre sur l'étude de la biodégradation du Bleu d'Evans par HPLC et analyse le spectre de dégradation des différents colorants azoïques par les *Streptomyces* isolées. Le mémoire se conclut par une synthèse générale et des perspectives pour la continuation de ce travail expérimental.

Références

- Ali, S.S., Rania Al-Tohamy, R., Koutra, E., Kornaros, M., Khali, I M., Elsamahy, T., El-Shetehy, M., Sun, J., 2021. Coupling azo dye degradation and biodiesel production by manganese-dependent peroxidase producing oleaginous yeasts isolated from wood-feeding termite gut symbionts. *Biotechnol. Biofuels*. 14, 1-25.
- Al-Tohamy, R., Kenawy, E.R., Sun, J., Ali, S.S., 2020. Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Sterigmatomyces halophilus* SSA-1575 for azo dye decolorization and detoxification. *Front. Microbiol.* 11, 1163.
- Chen, X., Memon, H.A., Wang, Y., Marriam, I., Tebyetekerwa, M., 2021. Circular economy and sustainability of the clothing and textile industry. *Mater. Circ. Econ.* 3, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s42824-021-00026-2>.
- Da Cruz Brambilla, C.M.C., Garcia, A.L.H., Da Silva, F.R., Taffarel, S.R., Grivicich, I., Picada, J.N., Scotti, A., Dalberto, D., Mišík, M., Knasmüller, S., Da Silva, J., 2019. Amido Black 10B a widely used azo dye causes DNA damage in pro-and eukaryotic indicator cells. *Chemosphere*, 217, 430-436.
- Goodfellow, M., 2012. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology*. Springer, New York, NY. 33, 2028.
- Lee, L.H., Cheah, Y.K., Mohd Sidik, S., Ab Mutalib, N.S., Tang, Y.L., Lin, H P., Hong, K., 2012. Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2125-2137.
- Louati, I., Elloumi-Mseddi, J., Cheikhrouhou, W., Hadrich, B., Nasri, M., Aifa, S., Woodward, S., Mechichi, T., 2020. Simultaneous clean up of Reactive Black 5 and cadmium by a desert soil bacterium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 190, 110103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110103>.
- Mahajan, G.B., Balachandran, L., 2012. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, 4(1), 240-253.
- Roy, D.C., Biswas, S.K., Saha, A.K., Sikdar, B., Rahma, M., Roy, A.K., Prodhan, Z.H., Tang, S.S., 2018. Biodegradation of Crystal violet dye by bacteria isolated from textile industry effluents. *Peer. J.* 6, e5015. <https://doi.org/10.7717/peerj.5015>.
- Shindhal, T., Rakholiya, P., Varjani, S., Pandey, A., Ngo, H.H., Guo, W., Ngo, H.Y., Taherzadeh, M.J., 2021. A critical review on advances in the practices and perspectives for the treatment of dye industry wastewater. *Bioengineered.* 12(1), 70-87. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1863034>.
- Shirazi, E.K., Metzger, J.W., Fischer, K., Hassani, A.H., 2020. Removal of textile dyes from single and binary component systems by Persian bentonite and a mixed adsorbent of bentonite/charred dolomite. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 598, 124807.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1. Généralité sur les colorants

Depuis les débuts de l'humanité, les colorants ont été au centre de nombreuses recherches liées à notre quotidien, notamment dans les domaines de la peinture et de la coloration du papier, de la peau et des vêtements, entre autres. Jusqu'à la moitié du XIX^e siècle, les colorants utilisés étaient principalement d'origine naturelle. On recourait alors à des pigments inorganiques tels que l'oxyde de manganèse, l'hématite et l'encre. En parallèle, des colorants naturels organiques étaient employés, en particulier dans l'industrie textile. Ces colorants étaient essentiellement des composés aromatiques extraits de plantes, comme l'alizarine et l'indigo.

L'industrie des colorants synthétiques a vu le jour en 1856 lorsque le chimiste anglais W. H. Perkin, dans sa tentative de synthétiser de la quinine artificielle pour traiter la malaria, réussit à créer la première matière colorante synthétique, qu'il nomma "mauve" (aniline, un colorant basique). Perkin déposa un brevet pour son invention et établit une chaîne de production, inaugurant ainsi une série d'autres développements similaires. De nouveaux colorants synthétiques commencèrent à apparaître sur le marché. Ce processus fut accéléré par la découverte de la structure moléculaire du benzène en 1865 par Kékulé. En conséquence, au début du XX^e siècle, les colorants synthétiques avaient largement supplanté les colorants naturels (**Welham, 2000 ; Houas et al., 2001**). La production globale de colorants synthétiques organiques est évaluée à 0,92 million tonnes par an, dont 280 000 tonnes sont libérées dans les eaux usées tout au long des différentes phases d'application et de fabrication (**Rápó et Tonk, 2021 ; Liu et al., 2022**).

I.1.1. Définition

Un colorant est une substance qui possède une couleur intrinsèque et qui, une fois introduite dans un milieu, y diffuse sa couleur en se dissolvant ou en se dispersant. Cette capacité à teindre est le résultat d'une affinité particulière entre le colorant et le substrat, ce qui crée des défis lors des processus de teinture. Les colorants synthétiques doivent satisfaire divers critères, selon leur application, pour assurer la longévité des couleurs sur les produits auxquels ils sont appliqués. Ces critères comprennent la résistance à l'abrasion, la stabilité face à la lumière, la résistance à l'oxydation chimique (notamment en présence de détergents) et la protection contre les attaques microbiennes (**Zawlotzki Guivarch, 2004**). Les matières colorantes sont classées en deux catégories principales selon la norme DIN 55944 (novembre 1973, Matières colorantes ; classification) :

Les colorants : ce sont des matières colorantes qui se dissolvent dans les solvants et les substrats.

Les pigments : ce sont des matières colorantes insolubles dans les solvants et les substrats.

Les colorants et les pigments sont deux termes qui ne doivent pas être confondus lorsqu'on parle de substances colorantes, car ils présentent des différences importantes. Les colorants se distinguent des pigments par leur capacité à se dissoudre dans le milieu d'application, tel que l'eau, tandis que les pigments, étant insolubles, sont suspendus dans un liant organique tel que l'huile ou la gomme, ce qui leur permet de colorer la surface.

Les substances colorantes se caractérisent par leur aptitude à absorber les rayonnements lumineux dans la plage du spectre visible, qui s'étend de 365 à 750 nm. La transformation de la lumière blanche en lumière colorée se produit par réflexion sur un objet, par transmission ou par diffusion, et résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés chromophores (**Zawlotzki Guivarch, 2004**). La molécule colorante, elle-même, est appelée le chromogène. Plus le groupe chromophore a une grande affinité de donner un électron, plus la couleur obtenue sera intense. Ces groupes chromophores sont classés par intensité décroissante dans le tableau 1. Il est à noter que les chromophores sont généralement des groupes aromatiques conjugués qui contiennent des liaisons non-liantes ou des complexes de métaux de transition. En outre, d'autres groupes d'atomes présents dans le chromogène peuvent intensifier ou modifier la couleur, ce que l'on appelle les "auxochromes" (**Franco et al., 2018 ; Mcyotto et al., 2021**).

Tableau 1 : Principaux groupes chromophores et auxochromes

Groupements chromophores	Groupements auxochromes
Azo ($-N=N-$)	Amino ($-NH_2$)
Nitroso ($-NO$ ou $-N-OH$)	Méthylamino ($-NHCH_3$)
Carbonyl ($>C=O$)	Diméthylamino ($-N(CH_3)_2$)
Vinyl ($-C=C-$)	Hydroxyl ($-OH$)
Nitro ($-NO_2$ ou $=NO-OH$)	Alkoxy ($-OR$)
Sulfure ($>C=S$)	Groupements donneurs d'électrons

En général, les colorants sont, essentiellement, constitués d'un agencement de groupes chromophores, auxochromes et de structures aromatiques conjuguées, telles que des cycles benzéniques, anthracène, térylène, etc. Lorsque le nombre de noyaux aromatiques augmente, la conjugaison des doubles liaisons se renforce, et le système conjugué devient plus étendu. Cela entraîne une réduction de l'énergie des liaisons, une augmentation de l'activité des

électrons, et, donc, un déplacement vers des longueurs d'onde plus grandes, ce que l'on appelle l'effet autochrome.

De la même manière, lorsqu'un groupe auxochrome donneur d'électrons, tel que amino, hydroxy, alkoxy, est ajouté à un système aromatique conjugué, ce groupe s'ajoute à la conjugaison du système, ce qui provoque une absorption à des longueurs d'onde plus grandes et donne lieu à des couleurs plus intenses (**Zhenwang et al., 2000**).

I.1.2. Classification des colorants

Les méthodes de classification les plus répandues dans les secteurs industriels se fondent sur les structures chimiques des colorants synthétiques et sur les techniques d'application sur divers supports (tels que textiles, papier, cuir, matières plastiques, etc.). Le classement des colorants en fonction de leur structure chimique est, essentiellement, basé sur la nature du groupe chromophore (voir tableau 1).

I.1.2.1. Les colorants azoïques

Ils représentent la famille la plus importante de colorants de synthèse en termes de production, avec une estimation d'environ 500 000 tonnes par an. Ils se distinguent par la présence du groupe $-N=N-$ dans leur structure (Figure 1), et leur teinte est déterminée par les chromophores liés à cette liaison. Selon le nombre de chromophores azo présents dans la molécule, on peut les classer en monoazoïques, diazoïques et polyazoïques (**Da Cruz Brambilla et al., 2019**).

Les colorants azoïques occupent une place prépondérante à la fois en termes d'application, représentant plus de la moitié de la production mondiale de colorants, et de diversité de structures étudiées (**Benkhaya et al., 2020**). Ils se divisent en plusieurs catégories, notamment les colorants basiques, acides, directs et réactifs solubles dans l'eau, ainsi que les azoïques dispersés et les mordants non ioniques insolubles dans l'eau. Environ 10 à 15 % des quantités initiales de ces colorants sont perdues pendant les processus de teinture et sont déversées sans traitement préalable dans les effluents (**Bauer et al., 2001**). Cependant, il est important de noter que ces composés organiques cancérogènes résistent généralement aux traitements conventionnels et présentent une biodégradation très limitée (**Chung, 2016**).

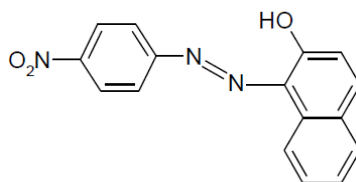


Figure 1 : Structure du rouge para

I.1.2.2. Les colorants anthraquinoniques

Du point de vue commercial, les colorants anthraquinoniques (Figure 2) occupent une place importante après les colorants azoïques. Leur formule générale, basée sur l'anthracène, révèle que le noyau quinonique constitue le chromophore auquel des groupes hydroxyles ou amino peuvent se lier (Zollinger, 2003).

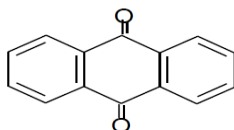


Figure 2 : Structure d'anthraquinone

I.1.2.3. Les colorants triphénylméthanés et leurs dérivés hétérocycliques

Les colorants triphénylméthanés (Figure 3) forment la classe de colorants synthétiques la plus ancienne. Bien qu'actuellement moins importants que les colorants azoïques et anthraquinoniques, ils conservent une certaine valeur commerciale en raison de leur capacité à couvrir toute la gamme de nuances. La coloration vive des triphénylméthanés est due à un grand système conjugué dans l'ion cationique. Le carbocation central est en liaison conjuguée avec les trois noyaux benzéniques, ce qui permet une forte délocalisation de la charge positive (Zollinger, 2003).

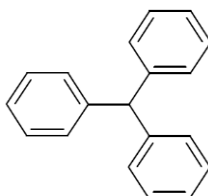


Figure 3 : Structure de triphénylméthane

I.1.2.4. Les colorants indigoïdes

Les colorants indigoïdes (Figure 4) tirent leur nom de leur origine, l'indigo. Les homologues séléniés, soufrés et oxygénés de l'indigo induisent d'importants effets hypochromes, ce qui signifie qu'ils réduisent l'intensité de la couleur par rapport à l'indigo original. Cela peut

conduire à une variété de couleurs allant de l'orange au turquoise, en fonction de la nature et de la disposition des substituants sur la molécule de base (**Zollinger, 2003**).

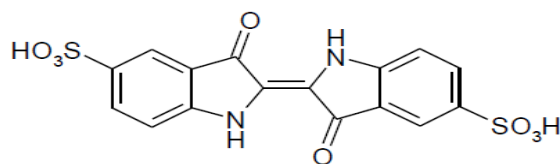


Figure 4 : Structure du carmin d'indigo

I.1.2.5. Les colorants xanthènes

Les xanthènes (Figure 5), notamment la fluorescéine, sont des colorants réputés pour leur forte capacité à émettre une fluorescence vive. Bien qu'ils ne soient pas largement employés comme agents de teinture, leur utilisation comme marqueurs en cas d'incidents maritimes ou comme traceurs pour suivre le cours des rivières souterraines est largement reconnue (**Zollinger, 2003**).

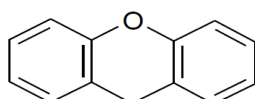


Figure 5 : Structure du xanthène

I.1.2.6. Les colorants phtalocyanines

Les colorants de type phtalocyanines (Figure 6) se caractérisent par leur structure élaborée qui repose sur un noyau central de cuivre. Pour obtenir ces colorants, on les synthétise en faisant réagir le dicyanobenzène en présence d'un halogénure métallique tel que le cuivre, le nickel, le cobalt, le platine, etc (**Zollinger, 2003**).

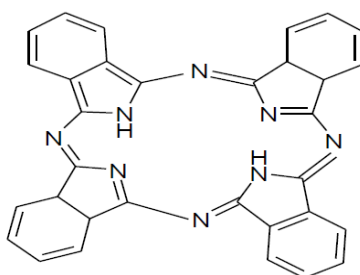


Figure 6 : Structure de la phtalocyanine

I.1.2.7. Les colorants nitrés et nitrosés

Ils représentent une catégorie relativement restreinte et ancienne de colorants. Leur utilisation persiste aujourd'hui en raison de leur coût très abordable, attribuable à la simplicité de leur structure moléculaire. Cette structure (Figure 7) se caractérise par la présence d'un

groupe nitro (-NO₂) positionné en position ortho par rapport à un groupe électrodonneur (Perrin et Scharff, 1999 ; Gordon et Gregory, 2012).

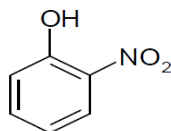


Figure 7 : Structure du colorant Nitrosé

I.1.3. Application industrielle des colorants

L'industrie des colorants représente un marché économique significatif en raison de la possibilité de colorer un large éventail de produits industriels, en particulier :

I.1.3.1. L'industrie agro-alimentaire

Les colorants alimentaires, également désignés sous le nom d'additifs colorés, sont utilisés pour donner une couleur aux produits alimentaires, renforcer leur teinte ou compenser la perte de couleur due à des facteurs tels que l'exposition à une lumière intense, à une chaleur excessive, ou à des variations de température. Introduits dans les aliments et les boissons, ils contribuent à uniformiser la couleur et à prévenir la décoloration. En outre, les colorants sont employés à des fins esthétiques afin de rendre les produits alimentaires attrayants visuellement pour les consommateurs (Hunger et Schmidt, 2019).

I.1.3.2. L'industrie pharmaceutique

Dans le domaine pharmaceutique, l'incorporation des colorants dans la formulation des médicaments vise à faciliter la reconnaissance et la distinction des médicaments prescrits, en particulier pour les patients qui utilisent plusieurs médicaments, par exemple ceux ayant des difficultés de lecture. De plus, ces colorants peuvent servir de codes marketing et potentiellement accroître l'efficacité du médicament grâce à un effet placebo. Par exemple, les couleurs jaune ou orange sont souvent associées aux médicaments fortifiants, les teintes pastel aux sédatifs, le bleu à des propriétés relaxantes, et le rouge à des effets stimulants. Par ailleurs, les colorants jouent un rôle dans l'évaluation de la stabilité des médicaments au fil du temps, car tout changement de couleur pendant le stockage peut indiquer une possible altération du principe actif (Hunger et Schmidt, 2019).

I.1.3.3. L'industrie textile

Pour l'industrie textile, la capacité d'un colorant à teindre est aussi cruciale que sa propre couleur. Cette propriété découle de l'affinité particulière entre le colorant et la fibre, ce qui présente des défis majeurs lors des traitements textiles. En fonction de l'application et de

l'utilisation prévues, les colorants synthétiques doivent répondre à divers critères pour assurer la durabilité des produits textiles auxquels ils sont appliqués, tels que la résistance à l'abrasion, la stabilité des couleurs face à la lumière, la résistance à l'oxydation chimique (notamment aux détergents) et la résistance aux attaques microbiennes. Les colorants organiques, en particulier ceux ayant des caractéristiques acides ou basiques prononcées, présentent une affinité accrue pour les fibres, mais cela peut également les rendre moins enclins à la biodégradation, ce qui soulève des préoccupations environnementales **(Chung, 2016)**.

I.1.4. Toxicité des colorants

La toxicité des colorants azoïques par exposition aux colorants et à leurs métabolites n'est pas un fait nouveau. Dès 1895, une corrélation a été établie entre une augmentation des cas de cancer de la vessie chez les travailleurs de l'industrie textile et leur exposition prolongée aux colorants azoïques. Depuis lors, la recherche sur ces colorants a clairement démontré leurs effets cancérigènes chez les humains et les animaux **(Combes et Haveland-Smith, 1998 ; Tsuda et al, 2000)**.

Parmi les colorants azoïques, l'azobenzène est reconnu comme un composé génotoxique, tout comme l'amarante, la tartrazine et le rouge cochenille, qui sont parmi les plus dangereux pour la santé humaine **(Rani et Shanker, 2018)**. Dans la plupart des pays, ces colorants ont été retirés de la liste des additifs alimentaires en raison de leurs effets nocifs.

Les effets cancérigènes des composés azoïques sont attribués à leurs dérivés amines. La partie la plus instable de ces molécules est la liaison azo, qui peut facilement se briser sous l'action des enzymes présentes chez les mammifères, y compris l'homme, se transformant ainsi en composé amino cancérigène, comme : 1,4-phénylènediamine, 1-amino, 2-naphtol, benzidine et benzidine substitués comme *o*-toluidine (Figure 8) **(Rani et Shanker, 2018)**. La toxicité des colorants azoïques est aggravée en présence de substituants sur le noyau aromatique, en particulier des groupes nitro ($-\text{NO}_2$) et des halogènes. Selon l'Agence de Protection de l'Environnement, l'estimation des risques de cancer impose de fixer une concentration limite de 3,1 µg/L en colorant azoïque dans l'eau potable **(Bougueria, 2014)**.

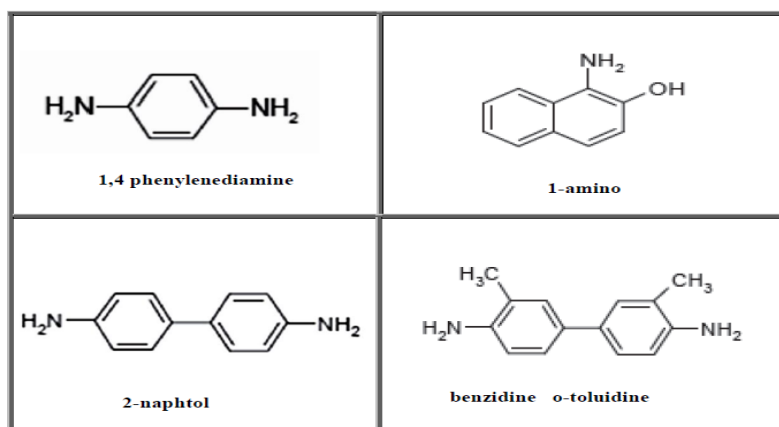


Figure 8 : Structures chimiques de quelques amines aromatiques toxiques

I.1.5. Impacts environnementaux des colorants

I.1.5.1. Effets à court terme

i. Eutrophisation : Lorsque les colorants sont présents dans l'environnement, ils libèrent des nitrates et des phosphates sous l'action des micro-organismes. En cas d'excès, ces ions minéraux deviennent nocifs pour les poissons et peuvent compromettre la qualité de l'eau potable. De plus, leur absorption par les plantes aquatiques favorise leur croissance excessive, entraînant une diminution de l'oxygène en raison de l'inhibition de la photosynthèse dans les couches les plus profondes des cours d'eau et des étendues d'eau stagnante (**Chequer et al., 2013 ; Hassan et al., 2017**).

ii. Sous-oxygénation : Lorsque des quantités importantes de matière organique sont déversées dans l'environnement par des décharges ponctuelles, les mécanismes naturels de régulation ne peuvent plus compenser la consommation d'oxygène par les bactéries. Selon (**Manahan, 1994**), la décomposition de seulement 7 à 8 mg de matière organique par les micro-organismes peut épuiser l'oxygène contenu dans un litre d'eau.

iii. Altération de la couleur, de la turbidité et des odeurs : L'accumulation de matières organiques dans les cours d'eau provoque des altérations telles que des goûts désagréables, une prolifération de bactéries, des odeurs nauséabondes et des colorations anormales. Selon (**Willmott et al., 1998**), une teinte anormale peut être détectée par l'œil humain à partir de 5×10^{-6} g/L. Outre leur aspect peu esthétique, les agents colorants ont la capacité d'entraver la transmission de la lumière dans l'eau, ce qui perturbe la photosynthèse des plantes aquatiques.

I.1.5.2. Effets à long terme

i. Persistance : Les colorants organiques synthétiques présentent une caractéristique de persistance, ce qui signifie qu'ils ne peuvent pas être naturellement dégradés par des processus biologiques (**Chung, 2016**). Cette persistance est étroitement liée à leur réactivité chimique :

- Les composés insaturés sont moins résistants que les composés saturés ;
- Les alcanes sont moins durables que les composés aromatiques ;
- La persistance des composés aromatiques augmente avec le nombre de substituants ;
- Les substituants halogénés augmentent la persistance des colorants plus que les groupes alkyles.

ii. Bioaccumulation : Si un organisme ne possède pas de mécanismes spécifiques pour empêcher l'absorption ou pour éliminer une substance une fois qu'elle est absorbée, celle-ci s'accumule. Les espèces situées en haut de la chaîne alimentaire, y compris les êtres humains, peuvent ainsi être exposées à des concentrations de substances toxiques jusqu'à mille fois supérieures à celles présentes initialement dans l'eau.

iii. Risque de cancer : Bien que la plupart des colorants ne soient pas intrinsèquement toxiques, une part significative de leurs métabolites le sont. Les effets mutagènes, tératogènes ou cancérogènes se manifestent après la dégradation de la molécule initiale en sous-produits d'oxydation, tels que les amines cancérogènes pour les colorants azoïques (**Tsuda et al., 2000**) ou les leuco-dérivés pour les triphénylméthanes (**Culp et al., 2002**).

iv. Formation de sous-produits chlorés : Le chlore utilisé pour éliminer les micro-organismes pathogènes réagit avec la matière organique pour former des trihalométhanes pouvant atteindre plusieurs centaines de mg/L (**Culp et al., 2002**). Ces composés sont associés au développement de cancers du foie, des poumons, des reins et de la peau chez l'homme.

I.1.6. Normes de rejet des colorants

La réglementation concernant le rejet des eaux usées devient de plus en plus rigoureuse. En Algérie, il existe une législation régissant les rejets d'effluents liquides provenant des industries (**JORA, 2006**). Les limites autorisées pour les rejets d'effluents de l'industrie textile sont détaillées au tableau 2.

Ainsi, toutes les installations produisant des effluents liquides industriels doivent être planifiées, construites et exploitées de manière à ce que les rejets liquides industriels à leur

sortie ne dépassent pas les seuils de rejet prescrits. De plus, elles doivent être équipées d'un système de traitement approprié pour réduire la quantité de polluants rejetée.

Cependant, dans de nombreux pays africains, y compris en Algérie, les conventions visant à établir les responsabilités en cas de rejets demeurent largement théoriques et peu appliquées dans la réalité.

Tableau 2 : Normes algériennes de rejets de l'industrie textile (JORA, 2006)

Paramètres	Unité	Valeurs limites	Tolérances aux valeurs limites anciennes installations
Température	°C	30	35
pH	-	6.5-8.5	6.0-9.0
DBO ₅	mg/L	150	200
DCO	"	250	300
Matières décantables	"	0.4	0.5
Matières non dissoutes	"	30	40
Oxydabilité	"	100	120
Permanganate	"	20	25

I.2. Procédés de traitement des eaux usées contenant des colorants

Lors du processus de teinture, diverses quantités de colorants sont généralement libérées dans l'environnement en grande partie en raison de leur adhérence variable aux fibres de cellulose. Le tableau 3 présente une synthèse des niveaux d'adhérence des différents colorants aux fibres textiles. Ces déchets organiques sont nuisibles et nécessitent une approche de dépollution appropriée (Easton, 1995 ; Sarker et al., 2019).

Tableau 3 : Estimation des degrés de fixation des différents colorants aux fibres textiles

Classe de colorant	Fixation (%)	Fibres utilisées
Acide	80-93	Laine, nylon
Azoïque	90-95	Cellulose
Basique	97-98	Acrylique
De cuve	80-95	Cellulose
Direct	70-95	Cellulose
Dispersé	80-92	Synthétique
Réactif	50-80	Cellulose
Soufré	60-70	Cellulose

En raison de la diversité de leur composition, le traitement des déchets textiles implique systématiquement la création d'une séquence de traitements visant à éliminer progressivement les divers polluants. La première étape implique l'élimination des impuretés insolubles à

travers des prétraitements tels que le dégrillage, le dessablage, le déshuilage, etc., ainsi que des traitements physiques ou physico-chimiques visant à séparer les phases solides et liquides. Selon **Barclay et Buckley. (2000)** et **Kurbus et al. (2002)**, les techniques de dépollution les plus couramment utilisées dans les industries textiles se répartissent en trois catégories distinctes :

I.2.1. Procédés physiques

I.2.1.1. Procédés membranaires

Une membrane est une barrière ayant une épaisseur allant de quelques centaines de nanomètres à quelques millimètres. Sous l'influence d'une force de transfert, telle qu'une différence de pression de part et d'autre de la membrane, une différence de potentiel électrique ou une différence de concentration, elle peut autoriser ou empêcher le passage de certains composants entre deux milieux qu'elle sépare. Quatre types de membranes sont distingués dans le traitement des eaux usées : la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (OI). Leurs capacités varient en fonction de la taille des pores de la membrane, qui se situe autour de 0,1 à 10 μm pour la microfiltration, de 10 nm à 1 μm pour l'ultrafiltration, de quelques nanomètres pour la nanofiltration, et elles présentent une structure dense (**Bouchard et al., 2000**).

Ces techniques de filtration sont employées pour récupérer et réutiliser de l'eau. Le choix de la membrane appropriée dépend de la composition et de la température des eaux usées textiles. Dans l'industrie textile, l'utilisation de membranes offre un potentiel prometteur pour le recyclage des colorants réactifs hydrolysés et des additifs utilisés dans le processus de teinture, permettant ainsi de réduire simultanément la demande biologique en oxygène (DBO_5), la demande chimique en oxygène (DCO) et la couleur des effluents textiles (**Chollom et al., 2015**). Cependant, les membranes présentent également des inconvénients majeurs tels que le coût initial élevé, le risque de colmatage de la membrane et la production de déchets supplémentaires contenant des colorants insolubles dans l'eau, tels que l'indigo et l'amidon, qui nécessitent un traitement supplémentaire (**Koyuncu et Güney, 2013**).

I.2.1.2. Procédé physicochimique de coagulation-floculation

La coagulation-floculation est un procédé physico-chimique qui accélère la séparation des particules en suspension dans l'eau par décantation gravitaire. On recourt à ce processus lorsque la décantation naturelle des matières en suspension dans l'eau s'avère insuffisamment rapide pour une efficacité optimale. Cette méthode repose sur l'ajout d'un coagulant qui forme

des agrégats avec les polluants organiques. Ces agrégats, appelés floccs, sont ensuite éliminés par décantation et filtration. Parmi les principaux coagulants utilisés pour déstabiliser les particules en suspension et générer des floccs, on trouve : le sulfate d'aluminium $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, l'aluminate de sodium NaAlO_2 , le chlorure ferrique $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, le sulfate ferreux $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, le sulfate ferrique $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Ces procédés se sont avérés efficaces pour décolorer les effluents textiles contenant des colorants de cuve, mais ils sont totalement inefficaces pour les colorants réactifs, azoïques, acides et basiques (**Vendevivere et al., 1998 ; Hao et al., 2000 ; Robinson et al., 2001**). De plus, la coagulation-floculation ne peut pas être utilisée pour les colorants hautement solubles dans l'eau. Enfin, cette méthode génère d'importantes quantités de boues, dont la réutilisation est la seule option, mais cela nécessite des investissements supplémentaires pour leur régénération.

I.2.1.3. Procédé d'adsorption

L'adsorption est un processus, tant physique que chimique, par lequel des molécules (adsorbats) présentes dans un liquide ou un gaz sont retenues à la surface d'un solide (adsorbant). Ce phénomène dépend à la fois de l'interface entre les deux et des caractéristiques physico-chimiques de l'adsorbat (**Raghavacharya, 1997 ; Hao et al., 2000 ; Robinson et al., 2001**). Cette méthode de séparation est largement employée pour éliminer la coloration des eaux usées contenant divers types de colorants. Les principales caractéristiques à prendre en compte lors du choix d'un adsorbant pour l'élimination des colorants sont : son affinité élevée, sa capacité d'adsorption des composés et sa capacité de régénération (**Jadhav et Srivastava, 2013**). Le charbon actif s'avère être un adsorbant efficace pour une vaste gamme de colorants (**Kannan et Sundaram, 2001 ; Wang et al., 2012**). Cependant, son coût élevé et la complexité de sa régénération limitent son utilisation dans le traitement des colorants (**Gálan et al., 2013**). De plus, le développement de nouveaux adsorbants naturels, abondants, économiquement viables et efficaces pour le traitement des écosystèmes, représente un défi majeur. Les bioadsorbants, tels que les déchets agricoles (**Sadaf et al., 2014 ; Singh et al., 2017**), les déchets forestiers (**Bouguettoucha et al., 2015 ; Khodabandehloo et al., 2017 ; Deniz et Kepekci, 2017**), ou les algues (**Mahalakshmi et al., 2015 ; Nautiyal et al., 2016 ; Fazal et al., 2018**), ont montré un potentiel prometteur en termes d'élimination des colorants.

I.2.2. Procédés chimiques

Ces procédés sont destinés aux colorants présents en faibles concentrations et qui résistent aux processus de biodégradation. Les méthodes chimiques les plus couramment utilisées sont

l'oxydation et la réduction. Les réactifs les plus fréquemment employés pour l'oxydation incluent H_2O_2 , O_2 , O_3 , Cl_2 , NaOCl et KMnO_4 , tandis que la réduction utilise généralement le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. L'oxydation chimique a pour résultat la destruction ou la décomposition de la structure moléculaire du colorant.

Il convient de noter que l'oxydation chimique avec l'un de ces oxydants ne s'avère pas toujours efficace dans le traitement des polluants organiques persistants et des colorants dispersés (Robinson et al., 2001 ; Anjaneyulu et al., 2005 ; Carmen et Daniela, 2012).

I.2.3. Procédés biologiques

Le traitement biologique repose sur la biodégradation, un processus principalement basé sur l'utilisation de micro-organismes, en particulier les bactéries. La biodégradation englobe l'ensemble des mécanismes de transformation d'une substance contaminante en divers sous-produits grâce à l'action des micro-organismes tels que les bactéries, les champignons et les levures (Sudha et al., 2018). Ce phénomène peut s'appliquer à divers milieux, qu'il s'agisse de sols, d'eau ou des différentes phases d'un polluant, qu'il soit sous forme liquide, solide ou gazeuse.

La biodégradation est un processus naturel résultant de la dégradation de molécules organiques par les micro-organismes. Ces derniers utilisent l'oxydation du carbone comme source d'énergie, et cette réaction implique également l'azote et le phosphore, qui jouent un rôle dans la synthèse protéique. Lorsque l'oxydant est l'oxygène, on parle de conditions aérobies. Dans le cas de l'anaérobiose, l'oxygène est remplacé par des composés tels que les nitrates, les sulfates ou le méthane. Plusieurs groupes de micro-organismes, y compris les bactéries, les champignons, les levures et les actinobactéries, sont responsables de la dégradation des colorants (Sudha et al., 2018).

I.2.4. Résumé comparatif des procédés et analyse critique

Malgré leur rapidité, les méthodes physiques, chimiques et physico-chimiques se sont révélées onéreuses et peu efficaces en termes de conformité aux normes requises. En effet, plusieurs études ont montré que ces méthodes sont partiellement efficaces contre certaines molécules colorantes, mais pas contre d'autres, et qu'elles peuvent même introduire dans l'environnement des polluants organiques parfois plus toxiques que les substances d'origine. Il est également important de noter que ces méthodes nécessitent un équipement sophistiqué et entraînent des coûts élevés (Al-Tohamy et al., 2020). Cette réalité a incité les chercheurs et

les industriels à se tourner vers des méthodes alternatives, plus efficaces et économiques, à savoir les procédés biologiques.

I.3. Les actinobactéries

I.3.1. Généralités

Le phylum Actinobacteria englobe l'un des plus vastes groupes de micro-organismes dans le règne bactérien, et ils se retrouvent dans une variété d'écosystèmes terrestres et aquatiques. Ces bactéries sont caractérisées par leur structure à Gram positif, et leur ADN possède une proportion élevée de guanine et de cytosine (G + C), dépassant généralement les 50 %. De manière générale, leur apparence est filamenteuse en raison de leur aptitude à former à la fois du mycélium substrat et du mycélium aérien.

Jusqu'à l'année 2016, la taxonomie des actinobactéries comptait pas moins de 374 genres différents (**Subramani et Sipkema, 2019**). Parmi eux, les *Streptomyces* qui se détachent comme le genre prédominant, tandis que d'autres actinobactéries, non affiliés aux *Streptomyces*, tels que les *Actinomyces*, *Kitasatospora*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* et *Rhodococcus*, représentent une diversité considérable. Par exemple, les *Streptomyces* regroupent une multitude d'espèces, chacune affichant une grande variabilité en termes de conditions de culture.

Cependant, les actinobactéries non affiliés aux *Streptomyces* se rencontrent moins fréquemment dans des conditions de culture standards, et leur isolement, conservation et culture nécessitent souvent des méthodes spécifiques (**Subramani et Aalbersberg, 2013**).

Le phylum Actinobacteria représente le groupe de micro-organismes le plus reconnu ayant la capacité de produire des composés bioactifs. Ainsi, les actinobactéries ont suscité un grand intérêt pour diverses applications dans les domaines pharmaceutique, biotechnologique, alimentaire, agricole et dans l'industrie des enzymes (**Azman et al., 2019**). De plus, il existe également un intérêt à utiliser les actinobactéries pour contribuer à la dégradation des polluants. Les actinobactéries constituent une méthode biologique économique et sûre pour éliminer les contaminants, car elles peuvent métaboliser les contaminants pour leur croissance (**Chaturvedi et Khurana, 2019**).

I.3.2. Morphologie et caractéristiques des actinobactéries

Les actinobactéries présentent des variations remarquables en termes de morphologie cellulaire (Figure 9) allant des coques de *Micrococcus*, des bâtonnets de *Mycobacterium*, des

hyphes ramifiés portant des spores telles que *Micromonospora*, et les mycéliums qui se fragmentent en cellules coccides et en forme de bâtonnet chez *Nocardia* et en actinobactéries produites à partir d'hyphes aériens ramifiés de 0,5 à 2 µm de diamètre comme les *Streptomyces*. (Hamed et Poorinmohammad, 2017).

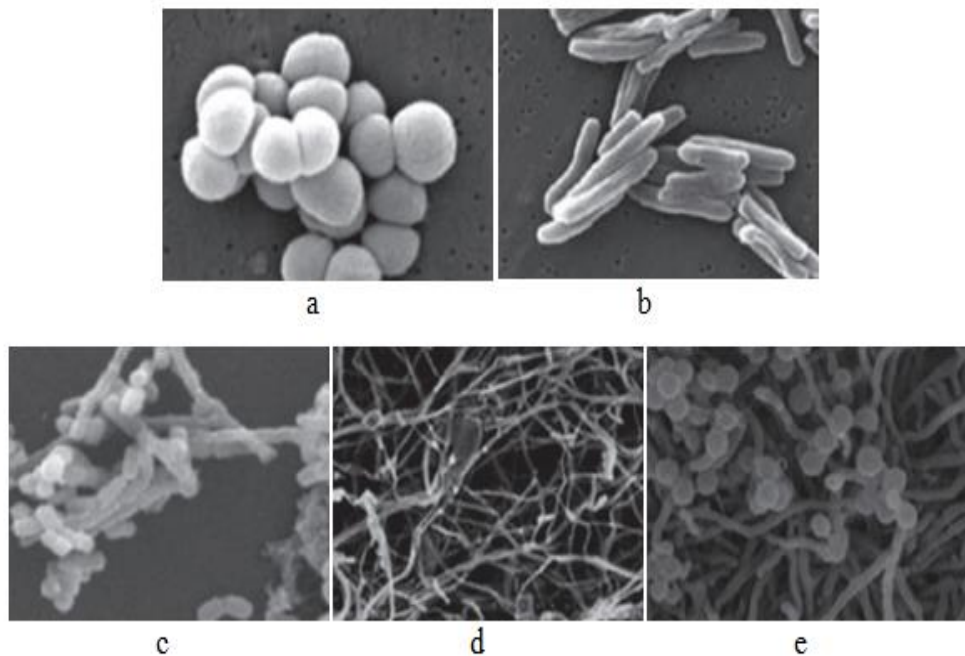


Figure 9 : Images au microscope électronique de : (a) coques de *Micrococcus luteus* , (b) bâtonnets de *Mycobacterium tuberculosis* , (c) hyphes ramifiés de *Micromonospora schwarzwaldensis* , (d) mycéliums fragmentés de *Nocardia asteroides* et (e) hyphes aériens ramifiés de *Streptomyces mangrovisoli* (Hamed et Poorinmohammad, 2017).

La croissance des actinobactéries sur différents types de milieux de culture, qu'ils soient solides (culture en surface) ou liquides (culture immergée), présente des caractéristiques distinctes qui méritent d'être examinées de plus près.

Dans des milieux liquides sous agitation, les cellules d'actinobactéries se développent en formant des agrégats appelés "pellets", sans formation du mycélium aérien ni de spores (Tamura et al., 1997). Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'agrègent pour former des pellets (Figure 10). Cependant, il convient de noter que certains actinobactéries, tels que *Nocardia coralline*, présentent un comportement différent. Dans ce cas, ces actinobactéries adoptent une morphologie en forme de bâtonnet et sont capables de se reproduire par fission binaire et fragmentation. Cette particularité est intéressante car elle offre une dynamique de croissance différente de celle observée dans les cultures en pellets.

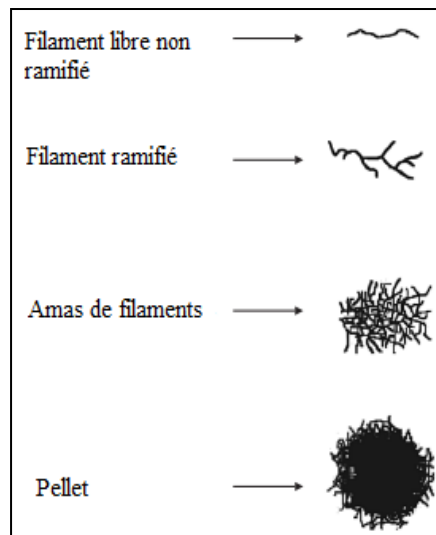


Figure 10 : Classes morphologiques de *Streptomyces olindensis* cultivées en cultures liquide (Pamboukian et al., 2002)

Lorsque ces mêmes actinobactéries sont cultivées à la surface de la gélose, en utilisant les mêmes composants que le milieu liquide, leur morphologie change encore. Ils se développent sous une forme filamenteuse avec un mycélium de substrat et un mycélium aérien (Figure 11). Le diamètre des colonies peut varier de 1 à 10 mm, et leur apparence peut être compacte, sèche, lisse, rugueuse, poudreuse, ou même avoir une forme ressemblant à un chou-fleur avec des contours lisses ou en échancrure. De plus, ces colonies ont souvent des pigments colorés, pouvant être blancs, crèmes, jaunes, violets, roses, gris, etc. (Perry et Stanley., 2004).

La variation dans la morphologie des actinobactéries en fonction du milieu de culture et des conditions environnementales souligne l'adaptabilité de ces micro-organismes et l'importance de comprendre leurs caractéristiques de croissance pour des applications microbiologiques et biotechnologiques. Cette information a été relevée dans une étude menée par (Thong-Oon , 2008).

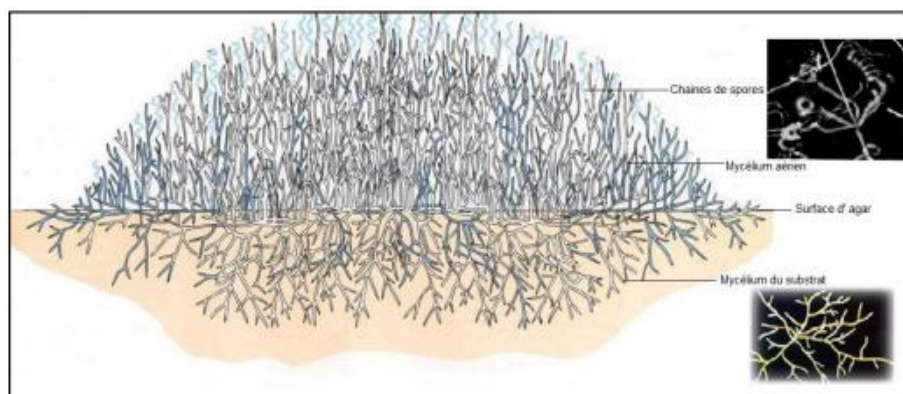


Figure 11 : Une coupe transversale d'une colonie d'actinobactérie poussant sur milieu gélosé (Li et al., 2016)

I.3.2.1. Mycélium du substrat

Connu également sous le nom de mycélium primaire ou végétatif, se développe dans le milieu de culture et a pour principale fonction l'absorption des nutriments nécessaires à la croissance des actinobactéries. Au microscope, il apparaît mince, transparent, de phase sombre et plus ramifié que les hyphes aériens. Ces hyphes simples ont une épaisseur d'environ 0,4 à 1,2 μm et ne présentent généralement pas de diaphragmes ni de fractures, mais peuvent se ramifier.

Les mycéliums de substrat peuvent présenter différentes couleurs telles que le blanc, le jaune, l'orange, le rouge, le vert, le bleu, le violet, le brun, le noir, et d'autres encore. Certains hyphes peuvent produire des pigments hydrosolubles ou liposolubles. Les pigments hydrosolubles peuvent se diffuser dans le milieu de culture, ce qui lui donne une couleur correspondante, tandis que les pigments liposolubles donnent à la colonie une couleur correspondante. La couleur du mycélium de substrat et la présence ou non de pigments solubles sont des éléments importants pour identifier de nouvelles espèces (**Li et al., 2016**).

I.3.2.2. Mycélium aérien

Le mycélium aérien est une partie développée de l'hyphe du mycélium du substrat qui pousse dans l'air. Parfois, il peut être difficile de distinguer les hyphes aériens des hyphes de substrat. Cependant, cette distinction est généralement possible en utilisant une préparation d'empreinte sur une lamelle et en observant les hyphes sous un microscope optique sec. Les hyphes du substrat sont minces, transparents et apparaissent sombres, tandis que les hyphes aériens sont plus épais, réfléchissants et brillants. Les hyphes du mycélium aérien ont souvent une gaine fibreuse, à l'exception des genres *Pseudonocardia* et *Amycolata*. À un niveau ultramicroscopique, ils sont composés d'éléments fibrillaires et de petits bâtonnets qui forment un motif distinctif. Cette gaine fibreuse se retrouve également sur les hyphes aériens impliqués dans la sporulation, ce qui contribue aux différentes textures superficielles des spores (**Li et al., 2016**). La formation de ces hyphes aériens varie en fonction de l'espèce, des conditions nutritionnelles et des facteurs environnementaux. Dans certains genres, le mycélium aérien se développe jusqu'à un certain stade dans la chaîne de spores de forme supérieure, qui produit des spores.

I.3.2.3. Chaîne de spores

Les actinobactéries se développent, se différencient en formant des hyphes aériens et des mycéliums porteurs de spores. La plupart des actinobactéries produisent des spores qui varient en longueur et en nombre : certaines ont deux spores (di- ou bisporées), d'autres en ont quelques-unes (oligosporeuses), et certaines en ont beaucoup (polysporeuses). La

classification des actinobactéries repose sur des caractéristiques telles que la longueur, la forme, la position et la couleur des chaînes de spores (**Li et al., 2016**).

Le genre *Streptomyces*, par exemple, produit des polyspores classiques qui forment de longues chaînes de plus de 50 spores. Les longues chaînes de spores de *Streptomyces* diffèrent en termes d'organisation spatiale et sont classées en type rectiflexible (Figure 12.a), type retinaculiaperti (Figure 12.b), type spire (Figure 12.c) et type verticillati (Figure 12.d).

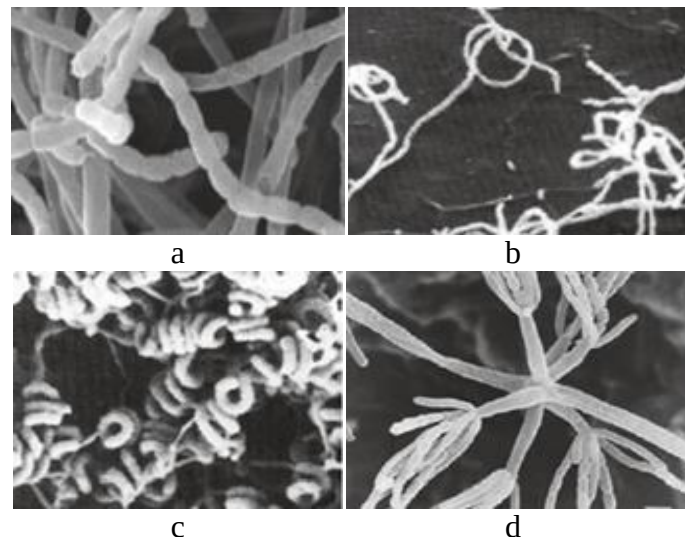


Figure 12 : Morphologie des longues chaînes de spores des espèces de *Streptomyces* (a) *Streptomyces plumbiresistens*, (b) *Streptomyces vinaceus*, (c) *Streptomyces hygroscopicus*, et (d) *Streptomyces verticillus* (**Wink et al., 2017**)

I.3.3. Écologie des actinobactéries et leur répartition dans la nature

Les actinobactéries sont des micro-organismes présents dans divers environnements naturels, en particulier dans le sol (Tableau 4). La plupart d'entre elles sont d'origine tellurique, ce qui signifie qu'elles proviennent du sol, représentant environ 10 à 20 % ou plus de la population bactérienne.

La densité de population des actinobactéries varie en fonction de leur environnement et des conditions climatiques prédominantes. Des facteurs tels que la température, le pH et l'humidité du sol jouent également un rôle dans leur croissance. La plupart des actinobactéries préfèrent des températures modérées, avec une croissance optimale autour de 25 à 30 °C, bien que certaines variétés thermophiles puissent se développer à des températures plus élevées, de l'ordre de 50 à 60 °C. En ce qui concerne le pH, la plupart des actinobactéries prospèrent dans des environnements avec un pH neutre et montrent leur meilleure croissance lorsque le pH se situe entre 6 et 9, avec une croissance optimale autour de la neutralité (**Al-Shaibani et al.,**

2021). Cependant, pour quelques *Streptomyces* on peut observer une croissance à des valeurs de pH inférieurs à 4 (Kim et al., 2003 ; McKinney, 2004).

Tableau 4 : Répartitions des actinobactéries dans la nature

Genre	Habitats
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines des non-légumineuses
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Sacharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

I.3.4. Cycle de vie des actinobactéries

Les actinobactéries ont un cycle de vie qui rappelle celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique sans noyau distinct, les à classer parmi les bactéries. De manière simplifiée, leur cycle de développement commence par la germination d'une spore sur un milieu solide (Figure 13). Cette germination conduit à la formation d'un mycélium végétatif composé d'hyphes ramifiés et multi-nucléaires, qui sont ancrés dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe ensuite à partir du mycélium végétatif, en utilisant ce dernier comme substrat. Le mycélium végétatif s'autolyse au fur et à mesure, et les produits de cette autolyse sont utilisés par le mycélium aérien. La croissance des hyphes est apicale, c'est-à-dire qu'elle se fait par le sommet, et elle est accompagnée de la formation de septa, qui divise les cellules en unités mono-nucléaires. Ces cellules se différencient ensuite pour devenir des spores. Si les spores sont localisées dans des sporanges, on les appelle des sporangiospores. (Flärdh et Bruttner, 2009).

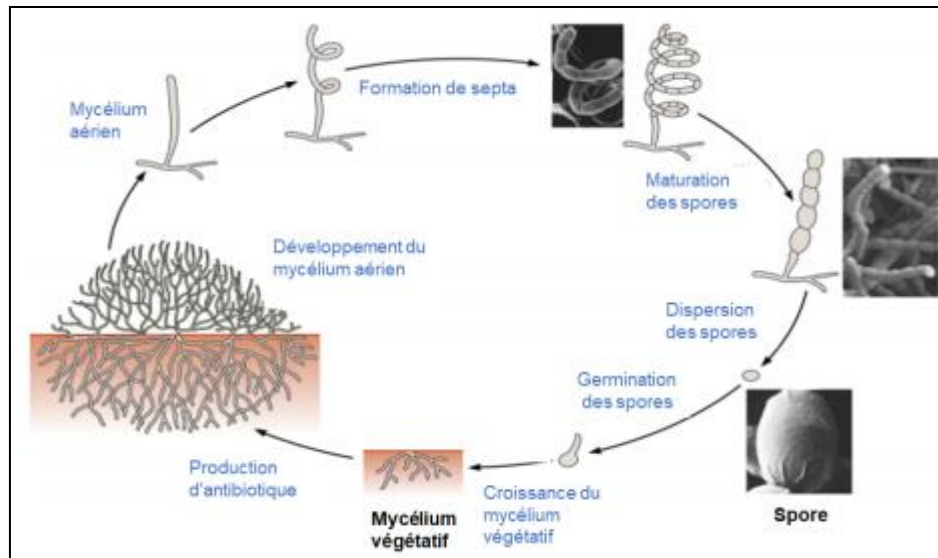


Figure 13 : Représentation schématique du cycle de développement des actinobactéries
(Barka et al., 2016)

I.3.5. Classification et taxonomie des actinobactéries

I.3.5.1. Organisation systématique des actinobactéries

La classification des actinobactéries a subi d'importants changements au fil du temps à mesure que de nouvelles connaissances ont été accumulées. Le phylum Actinobacteria est défini en fonction de sa position dans les arbres phylogénétiques de l'ARNr 16S. Une révision récente de la taxonomie du phylum Actinobacteria, basée sur les arbres phylogénétiques de l'ARNr 16S. Cette mise à jour a supprimé les rangs taxonomiques des sous-classes et des sous-ordres, en élevant les anciennes sous-classes et sous-ordres au rang de classes et d'ordres (**Gao et Gupta, 2012**). En conséquence, le phylum est maintenant divisé en six classes distinctes : Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria et Thermoleophilina (Figure 14).

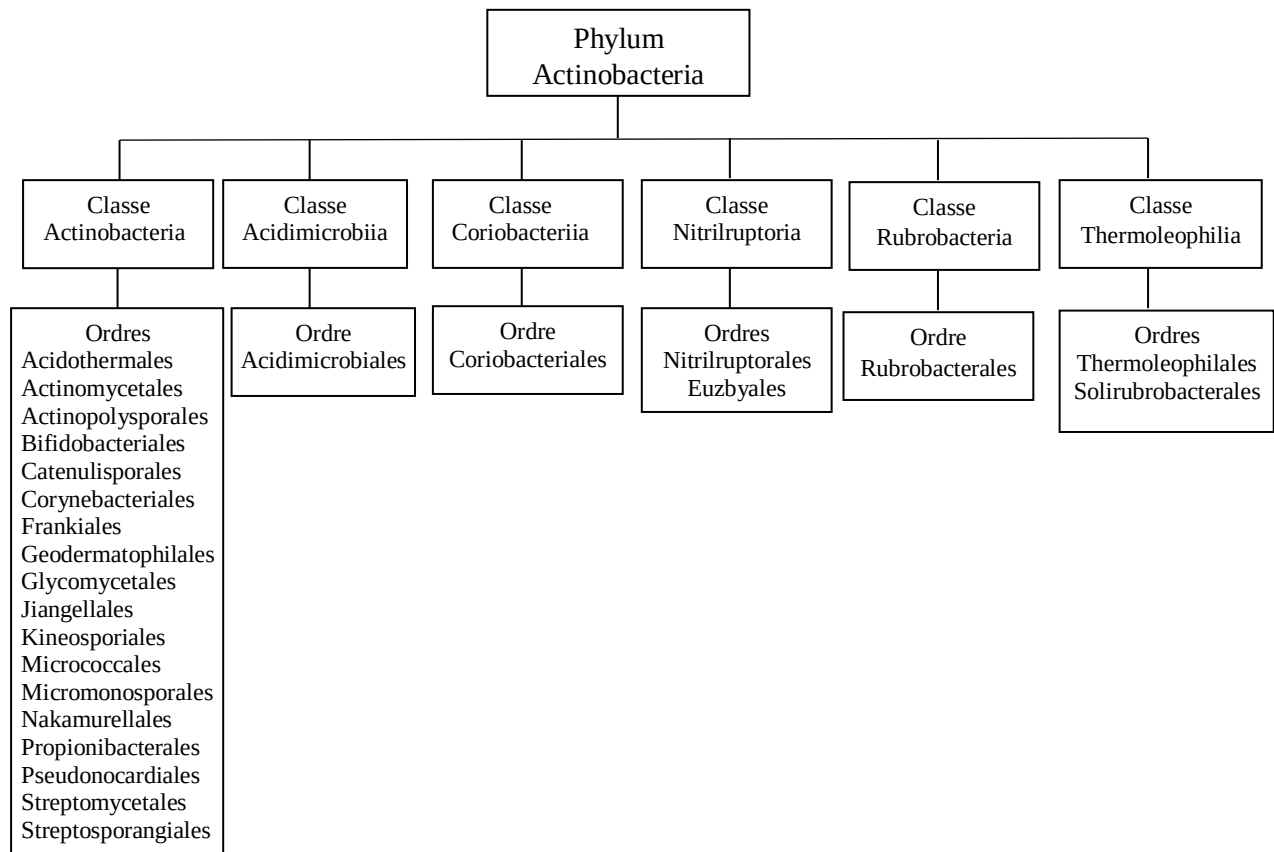


Figure 14 : Taxonomie des actinobactéries d’après le Manuel de Bactériologie Systématique de Bergey (Ludwig et al., 2012).

I.3.5.2. Critères de classification des actinobactéries

L'identification des actinobactéries repose actuellement sur une combinaison de critères morphologiques, physiologiques, chimiques et génétiques (Tableau 5). Certains genres, tels que *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Planomonospora*, *Dactylosporangium* et *Streptosporangium*, sont relativement faciles à identifier en raison de leurs caractéristiques micromorphologiques particulières. Cependant, dans la plupart des autres cas, il est nécessaire de recourir à d'autres critères pour parvenir à leur identification. Pour une identification fiable et précise au niveau des espèces et des sous-espèces, les caractéristiques physiologiques et, surtout, génétiques, sont essentielles (Lawson, 2018).

Tableau 5 : Principaux critères taxonomiques des actinobactéries

Critères taxonomiques		Références
Critères morphologiques	<ul style="list-style-type: none"> - Présence, abondance et disposition des hyphes du mycélium végétatif ou du mycélium aérien - Présence d'un mycélium du substrat - Le type et la couleur du mycélium aérien ainsi de substrat - Formation de Spores (nombre, mobilité, forme, taille et position sur les hyphes) - Présence ou non de sporanges et leurs types 	Badji et al., (2006) ; Letek et al., (2008) ; Flärdh et Bruttner, (2009)
Critères chimio-taxonomiques	<ul style="list-style-type: none"> - Composition de la paroi cellulaire (acides aminées, glucides et lipides) - Production d'antibiotiques - Tests biochimiques : (réduction de nitrates, hydrolyse de l'urée, hydrolyse de l'acide hippurique) 	Holt et al., (2000) ; Vollmer et al., (2008)
Critères moléculaires	<ul style="list-style-type: none"> - Hybridation ADN-ADN - Séquençage de l'ADNr 16s - Coefficient de Chargaff (% GC) 	Stackebrandt et al., (1997) ; Ventura et al., (2007) ; Zhi et al., (2009)

I.3.6. Applications des actinobactéries en biotechnologie

- Antibiotiques en médecine et en agriculture

Les actinobactéries ont la capacité à produire une vaste gamme de composés antibiotiques, qui offrent d'énormes avantages dans les domaines de la médecine et de l'agriculture. Depuis la première découverte de la Streptomycine à partir de l'isolat du sol, *Streptomyces griseus*. Les *Streptomyces* spp sont les micro-organismes les plus prisés dans les programmes de recherche industrielle pour le criblage de nouvelles substances actives. Environ 8000 antibiotiques ont été recensés chez les *Streptomyces* spp, un nombre bien supérieur à ce que l'on trouve chez les autres actinobactéries (**Berdy, 2005**).

- Potentiels antipathogènes des actinobactéries

Les métabolites produits par les actinobactéries, qu'ils proviennent du sol ou d'organismes endophytes, présentent un potentiel antimicrobien significatif. En fait, environ 70 % de ces nouveaux métabolites antimicrobiens sont générés par les actinobactéries (Yadav, 2020). Parmi toutes les actinobactéries, les *Streptomyces* spp ont joué un rôle exceptionnel dans la création de médicaments salvateurs tels que de nouveaux antibiotiques, des inhibiteurs enzymatiques, des antiviraux, des agents antitumoraux et des immunomodulateurs.

- Actinobactéries comme promoteurs de croissance des plantes

L'agriculture durable est importante pour stimuler la productivité alimentaire. La demande croissante de production alimentaire avec l'utilisation de méthodes conventionnelles par l'application de fongicides, d'herbicides, d'insecticides et d'engrais chimiques a des effets néfastes sur la santé humaine (Verma et al., 2017). En réponse, une approche respectueuse de l'environnement consiste à utiliser des micro-organismes bénéfiques pour améliorer les plantes et augmenter les rendements, ce qui s'est avéré être une stratégie efficace. Les actinobactéries, présentes en concentrations plus élevées dans la rhizosphère (la zone du sol autour des racines des plantes), jouent un rôle essentiel dans la promotion de la croissance des plantes en favorisant l'absorption de nutriments tels que l'azote, le phosphore et le fer.

- Production d'enzymes d'importance industrielle

Au cours des dernières décennies, la dégradation enzymatique de polymères ou de substrats complexes par des micro-organismes a suscité un intérêt considérable.

Les actinobactéries produisent une large gamme d'enzymes biologiquement actives. Elles ont la capacité de sécréter des protéases, des cellulases, des lipases, des xylanases, des pectinases et des amylases (Tableau 6). Ces enzymes revêtent une importance cruciale dans divers secteurs tels que l'industrie textile, l'industrie papetière, l'industrie alimentaire, la fermentation, ainsi que dans diverses applications biotechnologiques. En conséquence, les actinobactéries se sont avérées être une source prometteuse de L-asparaginase. De nombreuses actinobactéries, en particulier celles provenant du sol, comme *Nocardia* sp, *Streptomyces albidoflavus*, *S. griseus* et *Streptomyces karnatakensis*, ont été identifiées comme produisant diverses enzymes (Lewin et al., 2016).

Tableau 6 : Exemples d'enzymes provenant d'actinobactéries

Enzyme	Souche
Xylanase	<i>Streptomyces</i> spp
	<i>Actinomadura</i> spp
Cellulase	<i>Streptomyces ruber</i>
	<i>Thermomonospora</i> spp
Pectinase	<i>Streptomyces lydicus</i>
Amylase	<i>Nocardiopsis</i> spp
	<i>Streptomyces erumpens</i>
Chitinase	<i>Nocardiopsis prasina</i>
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>
	<i>Microbispora</i> spp
Protease	<i>Streptomyces pactum</i>
	<i>Nocardiopsis</i> spp
	<i>Thermoactinomyces</i> spp

- Potentiels de biodégradation des actinobactéries

Les actinobactéries sont connues pour leur efficacité à dégrader les contaminants dans le sol et dans l'eau. Le processus de dégradation des pesticides chimiques tels que le Carbofuran par les actinobactéries du sol a été documenté (**Jayabarath et al. 2010**). *Streptomyces abnosinicus*, *Streptomyces atratus*, *Streptoverticillium album*, *Nocardia farcinia*, *Nocardia vaccin*, *Nocardia amarae* et *Micromonospora chalcea* ont montré leur capacité à résister au Carbofuran dans des conditions de culture. Un *Streptomyces* sp a montré sa capacité à dégrader le chlorpyrifos, l'insecticide, en une forme moins toxique par hydrolyse.

Les hydrocarbures sont libérés dans l'environnement à la fois par des activités humaines et des sources naturelles. Certains types de bactéries, notamment des souches de *Rhodococcus* telles que *Rhodococcus jostii*, *Rhodococcus opacus* et *Rhodococcus ruber*, ont la capacité d'oxyder les n-alcanes grâce à des enzymes comme l'alcane 1-monooxygénase, des alcanes hydroxylases et des cytochromes qui permettent l'oxydation de substances étrangères. Ces bactéries peuvent également dégrader des hydrocarbures aromatiques tels que le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et le xylène. Par exemple, *Rhodococcus* sp. DK17 est capable de dégrader le toluène et l'o-xylène, tandis que *R. jostii* RHA1 peut assimiler efficacement l'éthylbenzène, l'isopropylbenzène et le biphényle (**Nalini et Prakash, 2020**).

I.4. Biodégradation des colorants par les actinobactéries

Les actinobactéries, qui étaient autrefois principalement utilisées pour produire des composés bioactifs comme les antibiotiques, sont aujourd'hui reconnues pour leur potentiel dans la dégradation de composés organiques, notamment les colorants azoïques (Tableau 7). Leur polyvalence et leur système enzymatique requis pour la dégradation des colorants chimiques ont suscité un intérêt mondial. En général, la dégradation des colorants implique l'activité d'enzymes telles que la lignine peroxydase, la laccase, la NADH-DCIP réductase ou l'azoréductase (**Sahasrabudhe et Pathade, 2013**).

Les actinobactéries, notamment *Nocardia corallina* et *Nocardia globerula*, ont montré une capacité variable à dégrader divers colorants synthétiques, y compris les colorants triphénylméthanes. (**Khalid et Mahmoud, 2014**) ont signalé que le colorant Crystal Violet a été complètement décoloré en 24 heures par *Nocardia corallina*. De plus, *Nocardia corallina* a également montré une capacité de décoloration pour d'autres colorants triphénylméthanes tels que le violet de méthyle, le violet d'éthyle, la fuchsine basique et le bleu Victoria, mais la décoloration maximale a été observée avec le colorant Crystal Violet. Ils ont suggéré que l'activité de décoloration des actinobactéries est intracellulaire, car aucune activité n'a été observée dans le filtrat de culture.

Tableau 7 : Biodégradation de quelques colorants synthétiques par les actinobactéries

Actinobactéries	Colorant	Résultats	Références
<i>Streptomyces globosus</i>	Rouge acide rapide	Décoloration (82 %) dans des conditions statiques	El-Sersy et al., (2011)
<i>Streptomyces</i> sp	Bleu réactif 160	Décoloration (> 98 %) du colorant en présence du lactose et d'urée dans les 48 h	Khobragade et Deshmukh, (2013)
<i>Streptomyces</i> sp.Cl	Indigocarmin diamant noir PV	Décoloration (83,7 %) en 2 h à pH 8 et 40 °C	Lu et al., (2013)
<i>Georgenia</i> sp. CC-NMPT-T3	Orange réactif 16	Décoloration (94,2 %) en 8 h à pH 6-8 et 28-45 °C	Sahasrabudhe et Pathade, (2013)
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	Orange réactif 16	Décoloration (85,6 %) en 24 h à pH 8 et 35 °C	Chittal et al., (2019)
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i> S203	Malachite green	Plus de 99 % du colorant ont été éliminés en 96 h	Vignesh et al., (2020)
<i>Streptomyces svinceus</i>	Congo red-21	Les 92 % du colorant ont été éliminés en 48 h à pH 6,5 et 30 °C	Chakravarthi et al., (2021)

I.4.1. Mécanismes de dégradation des colorants azoïques

Les micro-organismes ont plusieurs mécanismes potentiels pour éliminer les colorants azoïques, notamment la biosorption, la bioaccumulation, la réduction et l'oxydation. Cependant, il est important de noter que la biorestauration par biosorption et bioaccumulation est un processus lent et ne conduit souvent pas à une minéralisation complète des colorants **(Gadd, 2009)**. Dans ce cas, le rôle des actinobactéries dans la dégradation des colorants azoïques ou des sous-produits toxiques par les processus d'oxydo-réduction est très important.

1.4.1.1. Le processus biosorption/accumulation intracellulaire

Ce processus implique l'utilisation de solides d'origine naturelle pour la séquestration ou la séparation des solides des flux d'effluents. L'interaction entre les ligands de la paroi cellulaire et les adsorbats peut être expliquée par des mécanismes tels que l'échange d'ions, la complexation, la coordination et la microprécipitation, qui contribuent à l'élimination des couleurs. Plusieurs auteurs ont démontré que la biomasse, qu'elle soit vivante ou morte, présente d'excellentes capacités d'adsorption en raison de ses caractéristiques physicochimiques **(Crini et al., 2019)**. L'adsorption des polluants par des cellules vivantes ou mortes se produit selon deux modes différents : le premier, indépendant de l'activité métabolique de la cellule, implique une liaison ionique à la surface de la membrane cellulaire et du matériel extracellulaire, correspondant à une élimination passive, une biosorption. Le deuxième mode, dépendant du métabolisme cellulaire, entraîne l'élimination active du polluant à travers la membrane cellulaire **(Reyes-Ledezma et al., 2020)**.

1.4.1.2. Dégradation réductrice des colorants azoïques

Les colorants azoïques subissent généralement une décomposition en deux étapes par des micro-organismes **(Liu et al., 2011)**. Dans la première étape, ces microbes dégradent la liaison azoïque ($-N=N-$) des colorants azoïques en utilisant l'enzyme azoréductase dans des conditions de faible teneur en oxygène. Ce processus, connu sous le nom de décoloration, aboutit à la formation d'amines aromatiques incolores, qui sont ensuite minéralisées lors du processus d'oxydation. Malgré cela, il existe encore peu d'informations sur les voies de dégradation des colorants azoïques par les actinobactéries. L'enzyme azoréductase a été détectée chez quelques espèces d'actinobactéries, bien que son identification chez ces micro-organismes puisse être compliquée en raison de sa faible concentration. Pourtant, il est possible d'améliorer la production de cette enzyme chez les micro-organismes en utilisant des surfactants, comme le Tween-80 et le Tween-20, pour augmenter la production d'azoréductase chez les *Streptomyces*. Une étude plus approfondie de différentes enzymes dans le même hôte

a montré que le Tween-80 pouvait avoir un effet sélectif sur certaines enzymes, suggérant une interaction complexe. L'utilisation de Tween-20 a permis d'identifier des souches capables de décolorer les colorants, suggérant la libération de protéines plus abondantes dans les milieux de culture (Chou et al., 2005). Chengalroyen (2011) a également identifié l'azoréductase chez *Streptomyces coelicolor* par séquençage du génome. Cette étude fournit la preuve que l'azoréductase est également répandue chez les actinobactéries.

I.4.1.3. Dégradation oxydative des colorants azoïques

Dans le cas des actinobactéries, le processus d'oxydation est le mécanisme le plus dominant de dégradation des colorants azoïques (Priyaragini et al., 2013). Habituellement, la peroxydase ou les enzymes dégradant la lignine sont impliquées dans le processus de dégradation ; soit une seule enzyme est impliquée dans le processus, soit un groupe d'enzymes agissent en synergie. Des études ont montré que les peroxydases spécialisées dans la dégradation des colorants peuvent également dégrader les colorants anthraquinones non hydroxylés. De plus, l'utilisation combinée de lignine peroxydases et d'alcool vératylique s'est révélée bénéfique pour décolorer les colorants azoïques et anthraquinoniques. Le rôle des enzymes dégradant la lignine dans le traitement des effluents contaminés est très critique, car il nécessite une compréhension approfondie des organismes dégradant la lignine et de leurs systèmes enzymatiques.

Les laccases produites par *Streptomyces* ont également démontré leur efficacité pour décolorer les teintures textiles. Par exemple, une enzyme laccase produite par *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 a été utile pour la décoloration des colorants azoïques. Les laccases sont des enzymes polyvalentes en raison de leur faible spécificité de substrat (Tableau 8), ce qui leur permet d'oxyder divers composés, y compris les phénols et les amines aromatiques, en présence de médiateurs rédox (Morozova et al., 2007). Les souches de *Streptomyces* cultivées dans des conditions de fermentation à l'état solide sur de la paille de blé ont produit de nombreux composés phénoliques, qui peuvent servir de médiateurs naturels. Habituellement, ces composés sont générés par les micro-organismes pendant leur croissance ou lors de la dépolymérisation de la lignine. Par exemple, l'isolement de la lignine peroxydase de *Streptomyces kرائنسكii* SUK-5 a permis de dégrader complètement le colorant réactif bleu-59 en moins de 24 heures.

Tableau 8 : Différents types de laccases présentes chez les espèces du genre *Streptomyces*

Laccase	Espèce	pH optimal	Température optimale	Références
STSL	<i>Streptomyces lavendulae</i>	4.5	50 °C	Suzuki et al., (2003) ; Machezynski et al., (2004)
SLAC	<i>Streptomyces coelicolor</i>	9.4	60 °C	Dubé et al., (2008) ; Skálová et al., (2009)
SCLAC	<i>Streptomyces</i> sp	8.0	40 °C	Lu et al., (2013)
SilA	<i>Streptomyces ipomoea</i>	5.0	60 °C	Molina-Guijarro et al., (2009)
EpoA	<i>Streptomyces griseus</i>	6.4	40 °C	Endo et al., (2003)
Ssl1	<i>Streptomyces sviveus</i>	4.0	Haute température	Gunne et Urlacher, (2012)

I.4.2. Les facteurs affectant la biodégradation des colorants azoïques chez les actinobactéries

La biodégradation des colorants azoïques par les actinobactéries est un processus complexe, influencé par de nombreux facteurs, notamment la structure chimique du colorant, les conditions environnementales, la disponibilité des nutriments et la capacité enzymatique des bactéries. Une compréhension approfondie de ces facteurs est essentielle pour optimiser les processus de biodégradation dans des applications telles que le traitement des eaux usées contaminées par des colorants.

- **Structure chimique du colorant :** La structure chimique du colorant azoïque joue un rôle essentiel dans sa biodégradation. Les actinobactéries possèdent différentes enzymes capables de cliver la liaison azo ($-N=N-$) des colorants azoïques. La facilité de cette réaction dépend de la nature des groupes chimiques présents dans la molécule du colorant.
- **pH du milieu :** Le pH du milieu de culture peut influencer la biodégradation des colorants azoïques par les actinobactéries. Certaines actinobactéries sont plus efficaces à un pH spécifique, généralement proche de la neutralité. Des variations de pH en dehors de cette plage optimale peuvent réduire leur activité enzymatique et donc leur capacité à dégrader les colorants.
- **Température :** La température est un autre facteur important. Les actinobactéries ont des températures optimales de croissance et d'activité enzymatique spécifiques. Des

températures inadéquates peuvent ralentir ou inhiber la biodégradation des colorants azoïques.

- **Disponibilité de nutriments** : Les actinobactéries peuvent montrer une meilleure capacité de biodégradation lorsque des sources de carbone et d'azote appropriées sont présentées (Moosvi et al., 2007 ; Yemendzhiev et al., 2009). Parmi les différentes sources de carbone, citons le glucose, le lactose, la xylose, le maltose, le fructose et le galactose (Khobragade et Deshmukh, 2013). Parallèlement, ils ont procédé à une évaluation minutieuse de diverses sources d'azote, notamment l'urée, la peptone, l'extrait de levure, le nitrate d'ammonium, le chlorure d'ammonium et le nitrate de potassium, afin de déterminer leur efficacité dans le processus de dégradation de ces colorants.

- **Présence d'oxygène** : Certaines actinobactéries sont aérobies, ce qui signifie qu'elles ont besoin d'oxygène pour métaboliser les substrats. D'autres sont anaérobies, et elles peuvent également être impliquées dans la biodégradation des colorants dans des environnements pauvres en oxygène, tels que les boues d'épuration. Auparavant, des activités Azo-réductases ont été signalées dans des conditions statiques chez plusieurs espèces d'actinobactéries, telles que *Streptomyces coelicolor*, *Nocardia corallina* et *Nocardia globerula* (Bhaskar et al., 2003 ; Chengalroyen, 2011). Cependant, pour les laccases et les enzymes dégradant la lignine, l'agitation (aérobiose) se révèle plus efficace. Il a été signalé que les souches *Streptomyces cyaneus* CECT3335 et *Georgenia sp* montrent leur activité dans des conditions aérobies (Lu et al., 2013).

- **Présence de co-substrats** : Certains composés organiques peuvent servir de co-substrats pour les réactions de biodégradation des colorants azoïques. La présence de ces co-substrats peut stimuler l'activité des actinobactéries.

- **Activité enzymatique spécifique** : Les actinobactéries possèdent des enzymes spécifiques, telles que les azoréductases, qui sont responsables de la réduction des liaisons azo dans les colorants. La quantité et l'efficacité de ces enzymes peuvent varier d'une souche à l'autre, ce qui influence la capacité de dégradation des colorants.

- **Présence de métaux** : La présence de métaux dans le milieu peut influencer l'activité enzymatique. Certains métaux à faibles concentrations peuvent stimuler l'activité des enzymes, tandis que des concentrations élevées peuvent avoir un effet inhibiteur. Par exemple, la présence de Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité de la laccase de *Streptomyces sp.* (Lu et al., 2013). Par exemple, l'ajout de Cu^{2+} dans le milieu de culture provoque une augmentation de l'activité de la laccase produite par *Streptomyces sp* (Lu et al., 2013). De la même manière, la présence de certains ions métalliques tels que Co^{2+} ,

Ba^{2+} , Mn^{2+} et Fe^{3+} à de faibles concentrations stimule également l'activité enzymatique des espèces de *Streptomyces* (**Baldrian et al., 2006**). Cependant, des concentrations élevées de ces ions peuvent diminuer les performances des systèmes protéiques, ce qui peut entraîner l'inhibition ou l'inactivation complète de l'enzyme (**Jadhav et Kulkarni, 2014**).

I.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous présentons une synthèse bibliographique traitant les colorants azoïques qui entraînent des problèmes néfastes sur l'environnement, plus précisément, la pollution de l'eau.

De nombreuses publications ont reconnu l'importance de l'élimination et de la dégradation des colorants azoïques de l'environnement, en particulier de l'eau, en tant que source importante pour tous les organismes vivants. Les solutions à ce gros problème peuvent être classées en trois groupes, qui sont largement utilisés pour éliminer les colorants azoïques de l'environnement, ces technologies sont nommées chimiques, physiques et biologiques. En raison des inconvénients des méthodes chimiques et physiques de traitement, qui comprennent une faible efficacité, de grandes quantités de boues activées, une consommation d'énergie élevée et des coûts élevés. Par conséquent, la philosophie de la décoloration doit être améliorée, les méthodes biologiques semblent être les méthodes idéales pour l'élimination de la pollution par les colorants azoïques car elles sont respectueuses de l'environnement, ne produisent presque pas d'autres déchets toxiques ou de boues dans l'environnement et enfin, un faible-coût du traitement par rapport au traitement physique ou chimique. La méthode biologique comprend l'utilisation de micro-organismes pour éliminer les polluants par leurs voies métaboliques. Récemment, un grand nombre de chercheurs ont utilisé des micro-organismes dans le traitement des eaux usées pour éliminer les colorants azoïques, parmi ces organismes les bactéries ; algues ; actinobactéries ; champignons ; levures.

La dégradation des colorants azoïques par les actinobactéries revêt une importance significative à la fois sur les plans environnemental et industriel. Sur le plan environnemental, elle contribue à la réduction de la pollution de l'eau et du sol, en éliminant les colorants toxiques provenant de diverses industries, notamment textiles, alimentaires et pharmaceutiques. Cette biodégradation permet ainsi de prévenir la contamination environnementale et de protéger la santé des écosystèmes aquatiques et terrestres. Sur le plan industriel, la capacité des actinobactéries à dégrader les colorants azoïques offre une méthode durable et économique de traitement des effluents pollués, réduisant ainsi les coûts liés à l'élimination des déchets. En outre, cela ouvre la voie à de nouvelles possibilités de

production de biomatériaux et de produits chimiques à partir des colorants dégradés, contribuant ainsi à une économie circulaire plus respectueuse de l'environnement. En somme, la biodégradation des colorants azoïques par les actinobactéries joue un rôle essentiel dans la protection de l'environnement et le développement durable de l'industrie.

Références

- Al-Shaibani, M.M., Radin Mohamed, R.M.S., Sidik, N.M., Enshasy, H.A.E., Al-Gheethi, A., Noman, E., Al-Mekhlafi, N.A., Zin, N.M., 2021. Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from phylum actinobacteria and its therapeutic applications. *Molecules*. 26(15), 4504.
- Al-Tohamy, R., Kenawy, E.R., Sun, J., Al, i S.S., 2020. Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Sterigmatomyces halophilus* SSA-1575 for azo dye decolorization and detoxification. *Front. Microbiol.* 11, 1163.
- Anjaneyulu, Y., Sreedhara Chary, N., Samuel Suman Raj, D., 2005. Decolourization of industrial effluents—available methods and emerging technologies—a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 4, 245-273.
- Azman, A.S., Mawang, C.I., Khairat, J.E., AbuBakar, S., 2019. Actinobacteria—a promising natural source of anti-biofilm agents. *Int. Microbiol.* 22, 403-409.
- Badji, B., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N., 2006. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.* 52, 373-382.
- Bagewadi, Z.K., Vernekar, A.G., Patil, A.Y., Limaye, A.A., Jain, V.M., 2011. Biodegradation of industrially important textile dyes by actinomycetes isolated from activated sludge. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.* 1(3), 351-360.
- Baldrian, P., Merhautová, V., Gabriel, J., Nerud, F., Stopka, P., Hrubý, M., Beneš, M.J., 2006. Decolorization of synthetic dyes by hydrogen peroxide with heterogeneous catalysis by mixed iron oxides. *App. Cat. B: Environ.* 66(3-4), 258-264.
- Barclay, S., Buckley, C., 2000. Waste minimization guide for the textile industry, a step towards cleaner production, the pollution research group, University of Natal Durban, South Africa, for the South African. Water Research Commission. Volumes 1.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y., Van Wezel, G.P., 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80(1), 1-43.
- Bauer, C., Jacques, P., Kalt, A., 2001. Photooxidation of an azo dye induced by visible light incident on the surface of TiO₂. *J. Photochem Photobiol A: Chem.* 140(1), 87-92.
- Benkhaya, S., M'rabet, S., El Harfi, A., 2020. Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. *Heliyon*. 6(1).
- Berdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot, Tokyo*. 58:1-26.
- Bouchard, C., Kouadio, P., Ellis, D., Rahni, M., Lebrun, R.E., 2000. Les procédés à membranes et leurs applications en production d'eau potable. *Vecteur Environnement*. 33(4), 28-38.

- Bougueria, H., 2014. Synthèse et structure de complexes de métaux de transition à ligands azoïques tinctoriaux. THÈSE de Doctorat de l'Université de Constantine.
- Bouguettoucha, A., Chebli, D., Mekhalef, T., Noui, A., Amrane, A., 2015. The use of a forest waste biomass, cone of *Pinus brutia* for the removal of an anionic azo dye Congo red from aqueous medium. *Desalin. Water Treat.* 55(7), 1956-1965.
- Carmen, Z., Daniela, S., 2012. Textile organic dyes-characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents-a critical overview. *Rijeka: Intech Open.* 3, 55-86.
- Chakravarthi, B., Mathkala, V., Palempalli, U.M.D., 2021. Degradation and Detoxification of Congo Red Azo Dye by Immobilized Laccase of *Streptomyces sviveus*. *J. Pure. Appl. Microbiol.* 15(2).
- Chaturvedi, S., Khurana, S.P., 2019. Importance of actinobacteria for bioremediation. *Plant biotechnology: Progress in genomic era.* 277-307.
- Chequer, F.D., De Oliveira, G.R., Ferraz, E.A., Cardoso, J.C., Zanoni, M.B., De Oliveira, D.P., 2013. Textile dyes: dyeing process and environmental impact. *Eco-friendly textile dyeing and finishing.* 6(6), 151-176.
- Chengalroyen, M.D., 2011. Studies on triphenylmethane, azo dye and latex rubber biodegradation by actinomycetes. Thesis, School of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science University of Witwatersrand South Africa.
- Chittal, V., Gracias, M., Anu, A., Saha, P., Bhaskara Rao, K.V., 2019. Biodecolorization and biodegradation of Azo dye reactive orange-16 by marine *Nocardiosis* sp. *Iran. J. Biotechnol.* 17(3), 18-26. <https://doi.org/10.29252/ijb.1551>.
- Chollom, M.N., Rathilal, S., Pillay, V.L., Alfa, D., 2015. The applicability of nanofiltration for the treatment and reuse of textile reactive dye effluent. *Water S.A.* 41(3), 398-405.
- Chou, D.K., Krishnamurthy, R., Randolph, T.W., Carpenter, J.F., Manning, M.C., 2005. Effects of tween 20® and tween 80® on the stability of albutropin during agitation. *J. Pharma. Sci.* 94 (6), 138-1368.
- Chung, K.T., 2016. Azo dyes and human health: A review. *J. Environ. Sci. Health, Part C.* 34(4), 233-261.
- Combes, R.D., Haveland-Smith R.B., 1998. A review of the genotoxicity of food, drug, and cosmetic colour and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Research/Reviews in genetic toxicology.* 198, 101-243.
- Crini, G., Torri, G., Lichtfouse, E., Kyzas, G.Z., Wilson, L.D., Morin-Crini, N., 2019. Dye removal by biosorption using cross-linked chitosan-based hydrogels. *Environ. Chem. Lett.* 17(4), 1645-1666.
- Culp, S.J., Beland, F.A., Heflich, R.H., 2002. Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomolachite green. *Muta. Res.* 506-507, 55-63.

- Da Cruz Brambilla, C.M.C., Garcia, A.L.H., Da Silva, F.R., Taffarel, S.R., Grivicich, I., Picada, J.N., Scotti, A., Dalberto, D., Mišík, M., Knasmüller, S., Da Silva, J., 2019. Amido Black 10B a widely used azo dye causes DNA damage in pro-and eukaryotic indicator cells. *Chemosphere*, 217, 430-436.
- Deniz, F., Kepekci, R.A., 2017. Bioremoval of Malachite green from water sample by forestry waste mixture as potential biosorbent. *Microchem. J.* 132, 172-178.
- Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol.* 98(12), 2369-2385.
- Dubé, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Daneault, C., Beauregard, M., 2008. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 597-603.
- Easton J.R., 1995. The dye maker's view, in *Colour in dyehouse effluent*, P. Cooper, Editor. Society of Dyers and Colourists: Bradford, England. 9-21.
- El-Sersy, N.A., Abou-Elela, G.M., Hassan, S.W., Abd-Elnaby, H., 2011. Bioremediation of acid fast red dye by *Streptomyces globosus* under static and shake conditions. *Afr. J. Biotechnol.* 10(17), 3467-3474.
- Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T., Ueda, K., 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J. of Biochem.* 133(5), 671-677.
- Fazal, T., Mushtaq, A., Rehman, F., Khan, A.U., Rashid, N., Farooq, W., Xu, J., 2018. Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renew. Sust. Energ. Revi.* 82, 3107-3126.
- Flärdh, K., Bruttner, M.J., 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation In a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 36-49.
- Franco, J.H., Da Silva, B.F., Dias, E.F.G., De Castro, A.A., Ramalho, T.C., Zanoni, M.V.B., 2018. Influence of auxochrome group in disperse dyes bearing azo groups as chromophore center in the biotransformation and molecular docking prediction by reductase enzyme: Implications and assessment for environmental toxicity of xenobiotics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 160, 114-126.
- Gadd, G.M., 2009. Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84,13–28.
- Galán, J., Rodríguez, A., Gómez, J.M., Allen, S.J., Walker, G.M., 2013. Reactive dye adsorption onto a novel mesoporous carbon. *J. Chem. Eng.* 219, 62-68.
- Gao, B., Gupta, R.S., 2012. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76(1), 66-112.
- Gordon, P.F., Gregory, P., 2012. *Organic chemistry in colour*. Springer Science & Business

Media.

- Gunne, M., Urlacher, V.B., 2012. Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with unusual properties discovered by genome mining. PLoS One. 7(12), 52360.
- Hamedi, J., Poorinmohammad, N., 2017. The cellular structure of Actinobacteria. Biol. Biotechnol. Actinobacteria. 5-28.
- Hao, O.J., Kim, H., Chiang, P.C., 2000. Decolorization of wastewater. Crit. Rev. Environ Sci. Technol. 30(4), 449-505.
- Hassaan, M.A., El Nemr, A., Hassaan, A., 2017. Health and environmental impacts of dyes: mini review. Am. J. Environ. Sci. Engineer. 1(3), 64-67.
- Houas, A., Lachheb, H., Ksibi, M., Elaloui, E., Guillard, C., Herrmann, J.M., 2001. Photocatalytic degradation pathway of methylene blue in water. Appl. Catal. B: Environ. 31(2), 145-157.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Will. & Kilk. 15, 619-623.
- Hunger, K., Schmidt, M.U., 2019. Industrial Organic Pigments: Production, Crystal Structures, Properties, Applications. John Wiley & Sons.
- Jadhav, A.J., Srivastava, V.C., 2013. Adsorbed solution theory based modeling of binary adsorption of nitrobenzene, aniline and phenol onto granulated activated carbon. J. Chem. Eng. 229, 450-459.
- Jadhav, R.S., Kulkarni, S.W., 2014. Isolation and characterization of keratinolytic *Streptomyces coelicoflavus*. World. J. Pharma. Res. 4, 1829-1838.
- Jayabarath, J., Musfira, S.A., Giridhar, R., Arulmurugan, R., 2010. Biodegradation of carbofuran pesticide by saline soil actinomycetes. Int. J. Biotechnol. Biochem. 6(2), 187-193.
- JORA, 2006 : Journal Officiel de la République Algérienne N°26.
- Kannan, N., Sundaram, M.M., 2001. Kinetics and mechanism of removal of methylene blue by adsorption on various carbons—a comparative study. Dyes and pigments. 51(1), 25-40.
- Khalid, A., Mahmood, S., 2014. The biodegradation of azo dyes by actinobacteria. In Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters. Cham: Springer. Int. Pub. pp, 297-314.
- Khobragade, R.M., Deshmukh, A.M., 2013. Effect of carbon, nitrogen and metal ions on biodegradation of the textile dye Reactive Blue 160 by *Streptomyces* species. J. Emp. Bio. 1(2), 24-29.
- Khodabandehloo, A., Rahbar-Kelishami, A., Shayesteh, H., 2017. Methylene blue removal

- using *Salix babylonica* (Weeping willow) leaves powder as a low-cost biosorbent in batch mode: Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. *J. Mol. Liq.* 244, 540-548.
- Kim, S.B., Lonsdale, J., Seong, C-N., Goodfellow, M., 2003. *Streptacidiphilus* gen. nov. acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* .Waksman and Henrici (1943) AL emend. Rainey et al. 1997. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83, 107-116.
- Koyuncu, I., Güney, K., 2013. Membrane-based treatment of textile industry wastewaters. *Encyclopedia of Membrane Science and Technology*, 1-12.
- Kurbus, T., Slakar, Y.M., Le Marechal, A.M., 2002. The study of the effect of the variables on H₂O₂/UV decoloration of vinylsulphone dye : Part II. *Dyes pigments*. 54, 67-78.
- Lawson, P.A., 2018. The phylum actinobacteria. In *The Bifidobacteria and Related Organisms* . Academic Press. pp, 1-8.
- Letek, M., Ordonez, E., Vaquera, J., Margolin, W., Flärdh, K., Mateos, L.M., Gil, J.A., 2008. DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete. *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190, 3283–3292.
- Lewin, G.R., Carlos, C., Chevrette, M.G., Horn, H.A., McDonald, B.R., Stankey, R.J., Fox, B.G., Currie, C.R., 2016. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 235-254.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C., 2016. Morphological identification of actinobacteria. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*. 59-86.
- Liu, X., Zhang, J., Jiang, J., Lib, R., Xiea, Z., Li, S., 2011. Isolation a *Candida* strain capable of degrading reactive blue 13 and bioaugmentation of aerobic sequencing batch reactors. 978-1-4244-5089- 3/11/\$26.00 ©2011 IEE.
- Liu, Y., Jiang, Z., Fu, J., Ao, W., Siyal, A.A., Zhou, C., Zhang, C., 2022. Iron-biochar production from oily sludge pyrolysis and its application for organic dyes removal. *Chemosphere*, 301, 134803.
- Lu, L., Zeng, G., Fan, C., Ren, X., Wang, C., Zhao, Q., Jiang, M., 2013. Characterization of a laccase-like multicopper oxidase from newly isolated *Streptomyces* sp. C1 in agricultural waste compost and enzymatic decolorization of azo dyes. *Biochem. Eng. J.* 72, 70-76.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., Whitman, W.B., 2012. Road map of the phylum Actinobacteria. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, NY. pp, 1-28.
- Machczynski, M.C., Vijgenboom, E., Samyn, B., Canters, G.W., 2004. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein science*. 13(9), 2388-2397.

- Mahalakshmi, S., Lakshmi, D., Menaga, U., 2015. Biodegradation of different concentration of dye (Congo red dye) by using green and blue green algae. *Int. J. Environ. Res.* 9(2), 735-744.
- Manahan, S.E., 1994. *Environmental chemistry*, 6e Ed, U.S.A: Lewis publisher.
- McKinney, R.E., 2004. *Environmental Pollution Control Microbiology*. CRC Press :New York. pp, 448.
- Mcyotto, F., Wei, Q., Macharia, D.K., Huang, M., Shen, C., Chow, C.W., 2021. Effect of dye structure on color removal efficiency by coagulation. *Chem. Eng. J.* 405, 126674.
- Molina-Guijarro, J.M., Pérez Torres, J., Muñoz Dorado, J., Guillén Carretero, F., Moya Lobo, R., Hernández Cutuli, M., Arias Fernández, M.E., 2009. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*.
- Moosvi, S., Kher, X., Madamwar, D., 2007. Isolation, characterization and decolorization of textile dyes by a mixed bacterial consortium JW-2. *Dyes and pigments.* 74(3), 723-729.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I., 2007. "Blue" laccases. *Biochem. Moscow.* 72, 1136-1150.
- Munagapati, V.S., Yarramuthi, V., Kim, Y., Lee, K.M., Kim, D.S., 2018. Removal of anionic dyes (Reactive Black 5 and Congo Red) from aqueous solutions using Banana Peel Powder as an adsorbent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, 601-607.
- Nalini, M.S., Prakash, H.S., 2020. Actinobacteria: diversity, plant interactions and biotechnology applications. *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture.* 199-244.
- Nautiyal, P., Subramanian, K.A., Dastidar, M.G., 2016. Adsorptive removal of dye using biochar derived from residual algae after in-situ transesterification: alternate use of waste of biodiesel industry. *J. Environ. Manage.* 182, 187-197.
- Pamboukian, C.R., Guimarães, L.M., Facciotti, M.C.R., 2002. Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Braz. J. Microbiol.* 33, 17-21.
- Perrin, R., Scharff, J.P., 1999. *Chimie industrielle*, 2ème Edition Dunod, PARIS. 661-678.
- Perry, J.J., Stanley, J.T., Lory, S., 2004. *Microbiologie*. Dun. 42, 320-321.
- Priyaragini, S., Sathishkumar, S.R., Bhaskararao, K.V., 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles using actinobacteria and evaluating its antimicrobial and cytotoxicity activity. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5(2), 709-712.
- Raghavacharya, C., 1997. Colour removal from industrial effluents – a comparative review of available technologies. *Chem. Eng. World.* 32, 53-54.
- Rani, M., Shanker, U., 2018. Metal hexacyanoferrates nanoparticles mediated degradation of carcinogenic aromatic amines. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 10, 36-50.
- Rápó, E., Tonk, S., 2021. Factors affecting synthetic dye adsorption; desorption studies: a

- review of results from the last five years (2017–2021). *Molecules*, 26(17), 5419.
- Reyes-Ledezma, J.L., Uribe-Ramírez, D., Cristiani-Urbina, E., Morales-Barrera, L., 2020. Biosorptive removal of acid orange 74 dye by HCl-pretreated *Lemna* sp. *Plos one*. 15(2), e0228595.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.* 77, 247-255.
- Sadaf, S., Bhatti, H.N., 2014. Batch and fixed bed column studies for the removal of Indosol Yellow BG dye by peanut husk. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45(2), 541-553.
- Sahasrabudhe, M., Pathade, G., 2013. Biodegradation of azo dye CI Reactive Orange 16 by an actinobacterium *Georgenia* sp. CC-NMPT-T3. *Int. J. Adv. Res.* 1, 91-99.
- Sarker, M.R., Chowdhury, M., Deb, A.K., 2019. Reduction of color intensity from textile dye wastewater using microorganisms: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 8(02), 3407-3415.
- Singh, G., Kim, I.Y., Lakhi, K.S., Srivastava, P., Naidu, R., Vinu, A., 2017. Single step synthesis of activated bio-carbons with a high surface area and their excellent CO₂ adsorption capacity. *Carbon*. 116, 448-455.
- Skálová, T., Dohnálek, J., Østergaard, L.H., Østergaard, P.R., Kolenko, P., Dušková, J., Hašek, J., 2009. The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *J. Mol. biol.* 385(4), 1165-1178.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47(2), 479-491.
- Subramani, R., Aalbersberg, W., 2013. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *App. Microbial. Biotechnol.* 97, 9291-9321.
- Subramani, R., Sipkema, D., 2019. Marine rare actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Mar. Drugs*. 17(5), 249.
- Sudha, P.N., Sangeetha, K., Vijayalakshmi, K., Barhoum, A., 2018. Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market. In *Emerging applications of nanoparticles and architecture nanostructures*. Elsevier. 341-384.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K., Inamori, Y., 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci, Biotechnol. Biochem.* 67(10), 2167-2175.
- Tamura, S., Park, Y., Toriyama, M., Okabe, M., 1997. Change of mycelial morphology in tyrosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 523-528.
- Thong-Oon, S., 2008. Screening for cytotoxicity of marine derived actinomycetes. M.Sc.

- thesis, Prince of Songkla University, Thailand.
- Tsuda, S., Matsusaka, N., Madarame, H., 2000. The comet assay in eight mouse organs: result with 24 azo compounds. *Mutat. Res.* 465, 11-26.
- Vendevivere, P.C., Bianchi, R., Verstraete, W., 1998. Treatement and creuse from the textile wetprocessing industry: review of emerging technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 72, 289-302.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., vanSinderen, D., 2007. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(3), 495-548.
- Verma, P., Yadav, A.N., Khannam, K.S., Saxena, A.K., Suman, A., 2017. Potassium-Solubilizing Microbes: Diversity, Distribution, and Role in Plant Growth Promotion. In: Panpatte DG, Jhala YK, Vyas RV, Shelat HN (eds) *Microorganisms for green revolution: volume 1: microbes for sustainable crop production*. Springer Singapore. pp, 125-149.
- Vignesh, A., Manigundan, K., Santhoshkumar, J., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., Radhakrishnan, M., Balagurunathan, R., 2020. Microbial degradation, spectral analysis and toxicological assessment of malachite green by *Streptomyces chrestomyceticus* S20. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 43, 1457-1468.
- Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 149-167.
- Wang, S., Ng, C. W., Wang, W., Li, Q., Hao, Z. 2012. Synergistic and competitive adsorption of organic dyes on multiwalled carbon nanotubes. *J. Chem. Eng.* 197, 34-40.
- Welham, A., 2000. The theory of dyeing (and the secret of life). *J. Soc. Dyers Colour.* 116,140-143.
- Willmott, N.J., Guthrie, J.T., Nelson, G., 1998. The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. *J. Soc. Dye. Colour.* 114(2), 38-41.
- Wink, J., Mohammadipanah, F., Hamed, J., 2017. (Eds.) *Biology and biotechnology of actinobacteria*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Yadav, A.N., 2020. Plant microbiomes for sustainable agriculture: current research and future challenges. Springer. Int. Pub. pp, 475-482.
- Yemendzhiev, H., Alexieva, Z., Krastanov, A., 2009. Decolorization of synthetic dye reactive blue 4 by mycelial culture of white-rot fungi *Trametes versicolor* 1. *Biotechnol. Equip.* 23(3), 1337-1339.
- Zawlotzki Guivarch, L., 2004. Organic pollutant treatment in aqueous medium by electrochemical advanced oxidation process BElectroFenton. Application to the mineralization of synthetic dyes. Marne La Vallée University.
- Zhenwang, L., Zhenlu, C., Jianyan, L., 2000. The PT dye molecular structure and its

- chromophoric luminescences mechanism. 15th World Conference on Non-Destructive Testing, Rome. 15-21.
- Zhi, X.Y., Li, W.J., Stackebrandt, E., 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(3), 589-608.
- Zollinger, H., 2003. Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments. John Wiley & Sons.

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1. Objectifs

Cette recherche a été menée au laboratoire de biologie des sols, de la faculté des sciences biologiques de l'USTHB, Alger. Cette étape cruciale de notre étude visait, principalement, à isoler des micro-organismes dotés de la capacité à décolorer et dégrader une gamme variée de colorants azoïques. L'idée principale derrière cette approche était de tirer parti de bactéries prélevées dans divers échantillons de sols en vue du développement d'un processus biologique novateur et efficace pour le traitement des effluents contenant une multitude de colorants synthétiques.

Dans ce chapitre spécifique de notre recherche, nous nous attardons sur les détails entourant les colorants azoïques que nous avons utilisés, en exposant leur composition précise ainsi que leur rôle essentiel dans notre méthodologie expérimentale. Nous avons également mis en lumière le matériel biologique qui a été au cœur de nos investigations, en soulignant son origine et sa pertinence pour notre étude.

Nous abordons également les méthodes analytiques qui ont été mises en œuvre pour évaluer les résultats de nos expérimentations. Ces méthodes incluent des techniques spécifiques de mesure et de quantification, permettant ainsi une évaluation rigoureuse de nos données.

De plus, nous avons présenté en détail les appareils et les équipements que nous avons utilisés tout au long de notre recherche, en précisant leur modèle, leur fonction et leur importance dans le cadre de nos expérimentations.

L'ensemble de ces informations détaillées contribue à une compréhension approfondie de la méthodologie et des approches pratiques que nous avons employées au sein de notre laboratoire pour mener à bien notre étude.

II.2. Réactifs utilisés

II.2.1. Réactifs chimiques

Au cours de cette recherche, des réactifs chimiques de qualité analytique, caractérisés par une pureté élevée, ont été employés. Le tableau 9 répertorie les formules chimiques, les taux de pureté, ainsi que les fournisseurs des divers composés utilisés dans cette étude.

Tableau 9 : Réactifs chimiques utilisés

Produit	Formule	Pureté	Fournisseur
Dipotassium hydrogène phosphate	K_2HPO_4	>98 %	Sigma-Aldrich
Dihydrogénophosphate de potassium	KH_2PO_4	100 %	Sigma-Aldrich
Sulfate de calcium dihydraté	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	99 %	Sigma-Aldrich
Sulfate de magnésium dihydraté	$MgSO_4 \cdot 2H_2O$	99 %	Sigma-Aldrich
Sulfate d'ammonium	$(NH_4)_2SO_4$	99 %	Panreac
Sulfate de fer	$FeSO_4$	99,9 %	Panreac
Acide chlorhydrique	HCl	37 %	Omega
Hydroxyde de sodium	NaOH	98 %	Omega
Chlorure de sodium	NaCl	>99 %	Sigma-Aldrich
Méthanol	CH_3OH	>99 %	Sigma-Aldrich

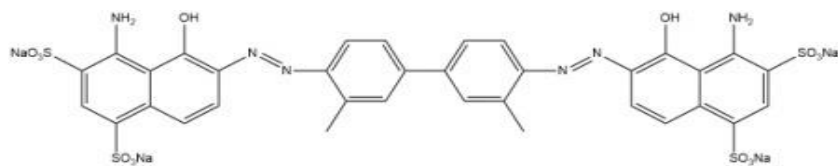
II.2.2. Les colorants

II.2.2.1. Structures et caractéristiques physico-chimiques des colorants

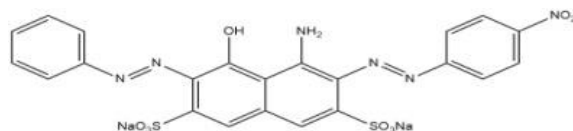
Le Bleu d'Evans, Noir amido 10B, Noir de chlorazol E, Rouge Congo, Rouge de méthyle, Nigrosine et Sudan II ont été retenus dans cette étude. Tous ces colorants ont été fournis par *Sigma-Aldrich* sous forme solide, avec une pureté supérieure à 99 %.

Les structures chimiques des colorants azoïques, examinés au cours de cette thèse, sont présentées à la Figure 15.

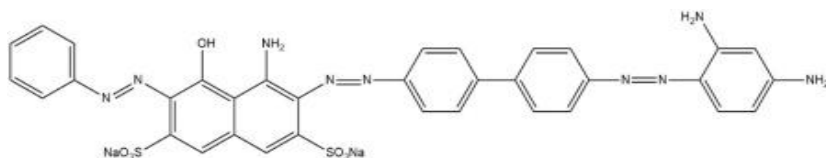
Bleu d'Evans (BE)



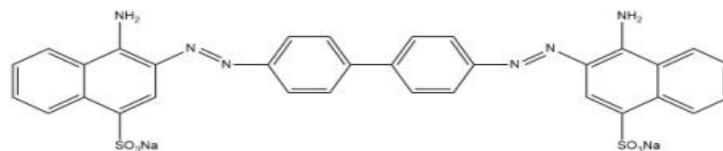
Noir amido 10B (NA)



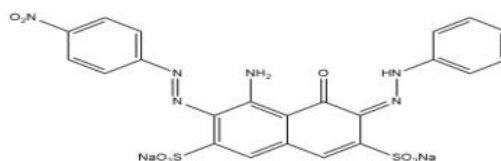
Noir de chlorazol E (NC)



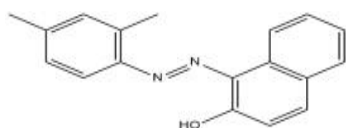
Rouge Congo (RC)



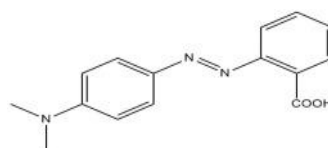
Nigrosine (NI)



Sudan II (SUD)



Rouge de méthyle (RM)

**Figure 15 :** Structures chimiques des colorants étudiés

Les caractéristiques physico-chimiques des colorants azoïques sont répertoriées au tableau 10.

Tableau 10 : Caractéristiques physico-chimiques des molécules cibles

Colorant	Nom technique	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau à 30 °C (g/L)	$\lambda_{\max}$ (nm)
Bleu d'Evans	Direct Blue 53	$C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$	960.809	Soluble	609
Noir amido 10B	Acid Black 1	$C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$	616.49	Soluble 30 g/L à 20 °C	622
Noir de chlorazol E	Direct Black 38	$C_{34}H_{25}N_9Na_2O_7S_2$	760.8	Soluble	578
Rouge Congo	Direct Red 28	$C_{32}H_{22}N_6O_6S_2$	696.66	Soluble 25 g/L à 20 °C	500
Rouge de méthyle	Acid Red 2	$C_{15}H_{15}N_3O_2$	269.3	Soluble 0,1 g/L à 20 °C	410
Nigrosine	Acid Black 2	$C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$	616.49	Soluble	576
Sudan II	Solvent Orange 7	$C_{18}H_{16}N_2O$	276.34	Insoluble	508

II.2.2.2. Préparation des solutions de colorants

Les colorants examinés dans cette étude ont été dissous dans de l'eau distillée pour atteindre une concentration de 50 mg/L. Pour le Bleu d'Evans, des solutions filles ont été préparées en diluant la solution mère.

Pour déterminer le spectre d'absorption du colorant (BE), un spectrophotomètre UV-Visible a été utilisé, en utilisant de l'eau distillée comme contrôle (blanc). Par la suite, l'absorbance des solutions préparées a été mesurée à la longueur d'onde maximale (609 nm). Les résultats obtenus serviront à établir une courbe d'étalonnage qui sera utilisée comme outil de quantification du colorant étudié (voir l'annexe).

II.3. Matériel biologique

II.3.1. Isolement et sélection des souches d'intérêt

II.3.1.1. Origine des souches

Des micro-organismes bactériens ont été isolés à partir d'échantillons de sol provenant de diverses régions d'Algérie, comme indiqué au tableau 11. L'échantillonnage a été réalisé par

nos collègues pendant l'année universitaire 2016/2017. Les prélèvements ont été effectués en prélevant la couche superficielle de terre après avoir retiré les cinq premiers centimètres de la surface du sol à l'aide d'une spatule ou d'une cuillère. Chaque échantillon a, ensuite, été transféré dans un sac en polyéthylène stérile, puis rapidement transporté au laboratoire dans une glacière. Les échantillons de sol ont été minutieusement étiquetés et conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 11 : Les différents sols utilisés dans l'étude

Numéro	Codes du laboratoire	Wilaya
01	LA001	ALGER
02	LA002	ALGER
03	LA003	ALGER
04	LA004	ALGER
05	LA005	ALGER
06	LA006	ALGER
07	LA007	ALGER
08	LA008	ALGER
09	LA009	ALGER
10	LA011	ALGER
11	LA013	ALGER
12	LB018	BLIDA
13	LB061	BLIDA
14	LBAI1	BEJAIA
15	LBAI2	BEJAIA
16	LBAI3	BEJAIA
17	LE001	EL OUED
18	LE002	EL OUED
19	LE003	EL OUED
20	LE004	EL OUED
21	LS001	S.BELABES
22	LS002	S.BELABES
23	LT049	TIZI OUZOU
24	LT050	TIZI OUZOU
25	LT055	TAMENRASSET
26	LT056	TAMENRASSET
27	LT057	TAMENRASSET
28	LT058	TAMENRASSET
29	LH001	H.MESSOUD
30	LH002	H.MESSOUD

II.3.1.2. Préparation des suspensions mères

Pour chaque échantillon de sol, des suspensions mères ont été préparées. Un gramme du sol est mis en suspension dans 9 mL d'eau physiologique stérile. Après agitation, une série de dilution est réalisée.

II.3.1.3. Techniques d'ensemencement et d'isolement des souches

Une quantité de 100 μ L de suspensions diluées ont été ensemencées en surface sur des boîtes de Pétri. Le milieu de culture est composé de la molécule cible (le colorant) et une supplémentation minérale (g/L) : EB 0,05, K_2HPO_4 0,08, KH_2PO_4 0,02, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0,005, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1, $FeSO_4$ 0,001, cycloheximide 0,05, gélose 15 et 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu a été ajusté à 7,0. Les inoculums ont été étalés à l'aide de billes de verre stériles de 3 mm de diamètre (**Sanders, 2012**). Ensuite, les boîtes sont placées dans une étuve à une température de 28 ± 2 °C pour l'incubation. Les colonies bien distinctes ainsi obtenues sont soumises à un processus d'isolement et de purification, en utilisant le même milieu de culture.

II.3.2. Repiquage, purification et conservation des souches

Après 5 jours d'incubation, les colonies entourées de zones décolorées, caractérisées par l'apparition d'un halo autour des colonies, ont été prélevées et ensemencées sur le même milieu d'isolement. Ensuite, elles ont été ré-incubées dans les mêmes conditions pour confirmer leur capacité à décolorer le Bleu d'Evans (BE) conformément à l'étude de **Chaieb et al. (2016)**. Au total, nous avons isolé 15 souches bactériennes. Celles-ci ont été purifiées par des passages successifs sur le même milieu d'isolement, puis sur un milieu TSA, afin d'obtenir des cultures pures. Parmi les 15 souches isolées, quatre isolats d'actinobactéries ont présenté une décoloration significative. Nous allons ensuite procéder à leur identification et évaluer leur potentiel de biodégradation vis-à-vis des différents colorants utilisés. Ces isolats ont été conservés dans une solution de glycérol et d'eau à 50 % (v/v) à une température de -40 °C.

II.3.3. Identification et caractérisation des isolats

Les quatre isolats sélectionnés pour leur capacité à décolorer le Bleu d'Evans sur milieu solide ont été nommés A011, A013, B061 et S1T049. L'extraction et le séquençage de l'ADN ont été réalisés par MacroGen Ltd. (Pays-Bas). Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences de gènes d'ARNr 16S de taxons validement décrits, disponibles sur le serveur

EzBioCloud (**Yoon et al., 2017**). L'analyse phylogénétique a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA 11 (**Tamura et al., 2021**). L'histoire évolutive a été déduite sur la base des séquences d'ADNr 16S en utilisant la méthode Neighbor Joining avec un test bootstrap de 1000 répliques (**Felsenstein, 1985**). Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance composite (**Tamura et al., 2004**). Toutes les analyses évolutives ont été menées à l'aide du logiciel MEGA 11 (**Tamura et al., 2021**).

II.4. Méthodes d'analyse

Les méthodes d'analyse utilisées dans cette étude comprennent la spectrophotométrie UV-Visible et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). La spectrophotométrie UV-Visible a été employée pour suivre précisément la décoloration du colorant azoïque Bleu d'Evans par les actinobactéries isolées, en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde donnée. Quant à la chromatographie HPLC, elle a été utilisée pour évaluer la biodégradation du colorant azoïque et détecter d'éventuels produits intermédiaires formés pendant le processus de dégradation, offrant ainsi une haute résolution pour séparer et identifier les composés présents dans les échantillons traités.

II.4.1. L'analyse par spectrophotométrie UV-Visible

Les quatre souches d'actinobactéries isolées ont été testées pour leur capacité à décolorer le Bleu d'Evans (50 mg/L) en milieu liquide.

Dans des tubes de centrifugation (114,55 x 27,94 mm, volume total 50 mL), une quantité de 2 % (v/v) de culture d'actinobactéries a été ajoutée à 15 mL de milieu liquide contenant (g/L) BE 0,05, K₂HPO₄ 0,08, KH₂PO₄ 0,02, CaSO₄·2H₂O 0,005, MgSO₄·7H₂O 0,05, (NH₄)₂SO₄ 0,1, FeSO₄ 0,001, Glucose 2 et 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu a été ajusté à 7,0. Les tubes inoculés ont été maintenus dans un incubateur-agitateur à 140 tr/min pendant 7 jours à 30 °C (**Pokharia et Ahluwalia, 2013**). Un tube témoin a, également, été préparé avec le même milieu liquide mais sans inoculum d'actinobactéries.

Des aliquotes de 1,5 mL ont été prélevées après 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h d'incubation pour contrôler le processus de décoloration, puis centrifugées à 10000 tr/min pendant 15 min et filtrées à l'aide d'un filtre seringue de 0,45 µm. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata.

La décoloration de (BE) a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu UV-1201, Japon), en mesurant le changement d'absorbance du surnageant de

culture par rapport aux témoins à $\lambda_{\max} = 609 \text{ nm}$ à différents moments. Le pourcentage de décoloration du colorant a, ensuite, été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$(\%) \text{ de décoloration} = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100$$

Avec :

A_i : Correspond à l'absorbance initiale mesurée à la longueur d'onde maximale du colorant ;

A_f : Correspond à l'absorbance finale enregistrée après incubation à la longueur d'onde maximale du colorant.

II.4.2. Etude des paramètres influençant la dégradation du Bleu d'Evans

II.4.2.1. Effet de la vitesse d'agitation

Dans le but d'étudier l'effet de la vitesse d'agitation du milieu sur la décoloration du Bleu d'Evans, cinq milieux ont été préparés ; ces milieux sont des solutions de Bleu d'Evans, de concentration $C = 50 \text{ mg/L}$ et un volume $V = 15 \text{ mL}$, contenues dans des tubes de centrifugation. Une quantité de $50 \mu\text{L}$ de solution de bactéries dégradant BE a été ajoutée aux six milieux contenant : (g/L) K_2HPO_4 0,08, KH_2PO_4 0,02, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, FeSO_4 0,001, Glucose 2 et 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu a été ajusté à 7,0.

Les tubes inoculés ont été maintenues dans un incubateur-agitateur à des vitesses d'agitation de 0, 80, 100, 120, 140 tr/min, pendant 7 jours à une température de 30°C . Un tube témoin a, également, été préparé avec le même milieu liquide mais sans inoculum d'actinobactéries.

II.4.2.2. Effet de la température

Ce test a pour but de déterminer l'influence de la variation de température sur l'efficacité de la biodégradation. De ce fait, cinq milieux ont été préparés. Ceux-ci sont des solutions de Bleu d'Evans, de concentration $C = 50 \text{ mg/L}$ et un volume $V = 15 \text{ mL}$, contenues dans des tubes de centrifugation. Une quantité de $50 \mu\text{L}$ de solution de bactéries dégradant EB a été ajoutée aux cinq milieux contenant : (g/L) K_2HPO_4 0,08, KH_2PO_4 0,02, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, FeSO_4 0,001, Glucose 2 et 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu a été ajusté à 7,0.

Les températures des milieux 1, 2, 3, 4, 5 sont, respectivement, de 4°C ; 20°C ; 30°C ; 40°C et 50°C . Les tubes inoculés ont été maintenus dans un incubateur-agitateur à 140 tr/min pendant 7 jours. Un tube témoin a, également, été préparé avec le même milieu liquide mais sans inoculum d'actinobactéries.

II.4.2.3. Effet du pH

L'objectif principal de cette étude sur l'effet du pH est d'analyser comment la variation du pH du milieu impacte la capacité des bactéries à dégrader le Bleu d'Evans. Plus précisément, cette recherche vise à déterminer si la biodégradation du colorant reste efficace ou non à différents niveaux de pH.

Pour ce faire, six milieux ont été préparés. Chacun de ces milieux est constitué d'une solution de Bleu d'Evans à une concentration de $C = 50 \text{ mg/L}$, avec un volume V de 15 mL , contenu dans des tubes de centrifugation. Dans ces six milieux, nous avons ajouté une quantité uniforme de $50 \text{ }\mu\text{L}$ d'une solution contenant des bactéries capables de dégrader le Bleu d'Evans. Par ailleurs, ces milieux contenant : (g/L) K_2HPO_4 0,08, KH_2PO_4 0,02, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, FeSO_4 0,001, Glucose 2 et 1 L d'eau distillée.

Les valeurs de pH des six milieux, numérotés de 1 à 6, étaient, respectivement, de 5, 6, 7, 8, 9 et 10. Les tubes inoculés ont, ensuite, été placés dans un incubateur-agitateur et maintenus à une vitesse de 140 tr/min pendant une période de 7 jours, à une température de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Un tube témoin a, également, été préparé en utilisant le même milieu liquide, mais sans ajout d'inoculum d'actinobactéries. Cette expérience a pour but d'analyser l'effet spécifique du pH sur la dégradation du Bleu d'Evans.

II.4.2.4. Effet de la concentration initiale du colorant

Dans le but d'explorer comment la concentration initiale du colorant impacte l'efficacité du traitement biologique, cinq milieux ont été préparés. Ceux-ci sont des solutions de Bleu d'Evans, de concentration (50, 60, 80, 100 et 120 mg/L) et un volume $V = 15 \text{ mL}$ contenus dans des tubes de centrifugation. Une quantité de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de solution de bactéries dégradant le BE a été ajoutée aux cinq milieux contenant : (g/L) K_2HPO_4 0,08, KH_2PO_4 0,02, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, FeSO_4 0,001, Glucose 2 et 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu a été ajusté à 7,0.

Les tubes inoculés ont été placés dans un incubateur-agitateur, où ils ont été maintenus à une vitesse de 140 tr/min pendant une période de 7 jours, à une température constante de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. En parallèle, un tube témoin a été préparé en utilisant le même milieu liquide. Cependant, aucun inoculum d'actinobactéries n'y a été ajouté.

II.4.2.5. Effet des sources de carbone

L'objectif de ce test est de déterminer comment la présence de différentes sources de carbone dans le milieu influence l'efficacité de la biodégradation. Dans notre étude, nous avons

sélectionné quatre sources de carbone, à savoir : le glucose, le saccharose, le fructose et le galactose. Pour cette évaluation, cinq milieux ont été préparés. Ceux-ci sont des solutions de Bleu d'Evans, de concentration $C = 50 \text{ mg/L}$ et un volume $V = 15 \text{ mL}$ contenus dans des tubes de centrifugation. Une quantité de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de solution de bactéries dégradant le BE a été ajoutée aux cinq milieux contenant : (g/L) K_2HPO_4 0,08, KH_2PO_4 0,02, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, FeSO_4 0,001 et 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu a été ajusté à 7,0. Dans chacun des milieux, les nutriments mentionnés précédemment ont été ajoutés individuellement à une concentration de 2 g/L . Un seul milieu a été préparé sans ajout de source de carbone.

Les tubes inoculés ont été maintenus dans un incubateur-agitateur à 140 tr/min pendant 7 jours à $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Un tube témoin a, également, été préparé avec le même milieu liquide mais sans inoculum d'actinobactéries.

II.4.2.6. Effet de la salinité du milieu

Afin d'examiner comment la concentration de NaCl influence l'efficacité de la biodégradation, six milieux ont été préparés. Ceux-ci sont des solutions de Bleu d'Evans, de concentration $C = 50 \text{ mg/L}$ et un volume $V = 15 \text{ mL}$ contenues dans des tubes de centrifugation. Une quantité de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de solution de bactéries dégradant le BE a été ajoutée aux six milieux contenant : (g/L) K_2HPO_4 0,08, KH_2PO_4 0,02, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, FeSO_4 0,001, Glucose 2 et 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu a été ajusté à 7,0. Les différentes concentrations de NaCl ajoutées aux milieux 1, 2, 3, 4, 5, 6 sont, respectivement : 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 et $1,2 \text{ mol/L}$.

Les tubes inoculés ont été maintenus dans un incubateur-agitateur à 140 tr/min pendant 7 jours à $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Un tube témoin a, également, été préparé avec le même milieu liquide mais sans inoculum d'actinobactéries.

II.4.2.7. Effet des ions métalliques

Pour évaluer l'importance de l'effet des ions métalliques sur la dégradation bactérienne des colorants, cinq ions métalliques ont été choisis (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Li^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+}). Pour faire ce test, cinq milieux ont été préparés. Ceux-ci sont des solutions de Bleu d'Evans, de concentration $C = 50 \text{ mg/L}$ et un volume $V = 15 \text{ mL}$ contenues dans des tubes de centrifugation. Une quantité de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de solution de bactéries dégradant le BE a été ajoutée aux cinq milieux contenant : (g/L) K_2HPO_4 0,08, KH_2PO_4 0,02, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, FeSO_4 0,001, Glucose 2 et 1 L d'eau distillée. Le pH du

milieu a été ajusté à 7,0, et, ensuite, les ions métalliques mentionnés précédemment ont été introduits individuellement dans chaque milieu à une concentration de 2 mM.

Les tubes inoculés ont été maintenus dans un incubateur-agitateur à 140 tr/min pendant 7 jours à 30 °C. Un tube témoin a, également, été préparé avec le même milieu liquide mais sans inoculum d'actinobactéries.

II.4.3. Analyse du colorant par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La dégradation du Bleu d'Evans par les souches d'actinobactéries a été évaluée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC YL 9100 - Young Lin Instrument, Co., Anyang, Corée). Après l'incubation (durée 168 h, température 30 °C, pH 7,0 et 140 tr/min), les milieux de culture ont été collectés et centrifugés à 10000 tr/min pendant 15 min. Ensuite, 1 mL de surnageant de chaque échantillon a été filtré à l'aide d'un filtre seringue de 0,45 µm ; un échantillon témoin (colorant BE non traité) a, également, été préparé. Les échantillons filtrés ont été analysés individuellement en injectant 20 µL dans le chromatographe afin de détecter les pics correspondants et de déterminer le temps de rétention de chaque échantillon. La séparation analytique a été effectuée en utilisant une colonne Teknokroma OSDA120-C18 de dimensions 250 mm x 4,6 mm. La phase mobile était un gradient d'un mélange de méthanol/eau (60 : 40, v/v), avec un débit de 0,5 mL/min. La détection s'est faite à l'aide d'un détecteur UV/Vis-9120 à 240 et 609 nm. La dégradation du colorant Bleu d'Evans a été quantifiée en comparant la surface du pic des échantillons après décoloration avec l'échantillon témoin (Xu et al., 2007).

II.4.4. Test de biodégradation des différents colorants azoïques

Dans le cadre de cette étude, nous avons entrepris des tests visant à évaluer la capacité des isolats d'actinobactéries à dégrader plusieurs types de colorants azoïques. Parmi ceux-ci, nous avons inclus le Noir amido 10B, le Noir de chlorazol E, le Rouge Congo, le Rouge de méthyle, la Nigrosine et le Sudan II.

Pour cette étude, nous avons préparé un milieu de culture identique à celui du Bleu d'Evans, avec une concentration finale de 50 mg/L de chaque colorant. L'ajustement précis du pH à 7,0 était une étape importante pour assurer des conditions optimales pour la dégradation.

Par la suite, les tubes contenant ces cultures d'actinobactéries ont été placés dans un incubateur-agitateur, où ils ont été maintenus à une vitesse de 140 tr/min. Ce réglage spécifique a été maintenu constant pendant une période de 7 jours, et la température a été

maintenue à 30 °C (**Pokharia et Ahluwalia, 2013**). Pour établir une base de comparaison, un tube témoin identique en composition au milieu liquide a été préparé, mais sans l'inoculation d'actinobactéries.

Afin de surveiller l'évolution du processus de décoloration, nous avons prélevé des aliquotes de 1,5 mL à la fin des 7 jours d'incubation. Ces échantillons ont, ensuite, été soumis à une centrifugation de 10000 tr/min pendant une durée de 15 minutes, puis filtrés avec une grande précision à l'aide d'un filtre seringue doté d'une porosité de 0,45 µm. Toutes les étapes expérimentales ont été, scrupuleusement, effectuées en triplicata pour garantir la fiabilité des résultats.

La décoloration des différents colorants azoïques a été évaluée grâce à l'utilisation d'un spectrophotomètre UV–Visible, en particulier le modèle Shimadzu UV-1201, Japon. Ce dispositif nous a permis de mesurer avec précision le changement d'absorbance du surnageant de culture par rapport aux témoins, en prenant en compte la longueur d'onde λ_{max} de chaque colorant, à divers moments de l'expérience. Cette méthodologie approfondie nous a fourni des données détaillées et fiables sur le degré de dégradation des colorants azoïques par les isolats d'actinobactéries, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de leur capacité de décomposition.

II.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les réactifs chimiques, les colorants azoïques et les micro-organismes, ainsi que les méthodes expérimentales de traitement biologique et les techniques d'analyse utilisées tout au long de ce travail.

Références

- Chaieb, K., Hagar, M., Radwan, N.R., 2016. Biodegradation and decolorization of azo dyes by adherent *Staphylococcus lentus* strain. Appl. Biol. Chem. 59 (3), 405-413. <https://doi.org/10.1007/s13765-016-0169-4>.
- Felsenstein, J., 1985. Phylogenies and the comparative method. The American Naturalist. 125(1), 1-15.
- Pokharia, A., Ahluwalia, S.S., 2013. Decolorization of xenobiotic azo dye-black WNN by immobilized *Paenibacillus alvei* MTCC 10625. Int. J. Environ. Bioremed. Biodegrad. 4 (2), 35-46. <https://doi.org/10.12691/ijebb-4-2-2>.
- Sanders, E.R., 2012. Aseptic laboratory techniques: plating methods. J. Vis. Exp. 63, 3064. <https://doi.org/10.3791/3064>.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (30), 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA 11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Mol. Biol. Evol. 38 (7), 3022-3027.
- Xu, M., Guo, J., Sun, G., 2007. Biodegradation of textile azo dye by *Shewanellade colorationis* S12 under microaerophilic conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76 (3), 719-726. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1032-7>.
- Yoon, S., Ha, S., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and wholegenome assemblies. Int. J. Syst. Evol. 67 (5), 1613-1617.

Chapitre III

Isolement et Identification des souches

III.1. Introduction

Dans cette partie nous nous sommes intéressées, en premier lieu, à l'isolement des bactéries qui sont présentes dans des échantillons de sol et qui sont capables de dégrader les colorants azoïques. L'élimination des colorants déversés dans la nature nécessitent l'intervention de différents facteurs. Parmi ceux-ci, la biodégradation par les micro-organismes, notamment les bactéries, est le processus naturel le plus important.

En second lieu, une caractérisation morphologique des souches isolées est faite. Il ressort que ces souches sont capables d'une décoloration significative des différents colorants pour lesquels nous avons testé le potentiel de biodégradation.

III.2. Isolement des souches

Après 5 jours d'incubation (à 28 ± 2 °C) sur un milieu solide contenant le Bleu d'Evans comme seule source de carbone, nous avons pu observer une croissance bactérienne et une décoloration du milieu à partir des isolats issus de 20 échantillons de sols sur les 30 examinés, soit une proportion de 66%. Ces résultats indiquent que le pool microbien des sols explorés (nord et sud du pays) s'est révélé capable d'induire une décoloration du milieu.

Cependant, parmi les isolats issus des 20 échantillons positifs, la grande proportion provenait du nord du pays (70%). En effet dans le sud du pays les facteurs édaphiques défavorables comme le déficit hydrique, la dessiccation, la salinité et les carences du sol peuvent affecter la richesse microbienne du sol (Amrani, 2010).

Après une observation à la loupe de l'ensemble des résultats positifs, 15 isolats criblés présentent des zones décolorées importantes ont été sélectionnés pour êtres purifiés et caractérisés.

III.3. Caractérisation des souches isolées

Pour la caractérisation des souches, nous avons procédé à une caractérisation morphologique (macroscopique et microscopique). Les observations ont été effectuées après 72 h d'incubation sur milieu de Bleu d'Evans et sur milieu TSA.

Les résultats des observations des souches bactériennes sur le milieu TSA sont regroupés au tableau 12. Après 72 h d'incubation à 28 ± 2 °C, l'ensemble des colonies des isolats présentent l'aspect macroscopique caractéristique des actinobactéries, ce sont des colonies d'aspect poudreux avec des formes filamenteuses (Figure 16). Pour les autres isolats, nous

avons pu observer différentes formes et aspects (circulaire, ponctiforme, crémeuse et muqueuse).

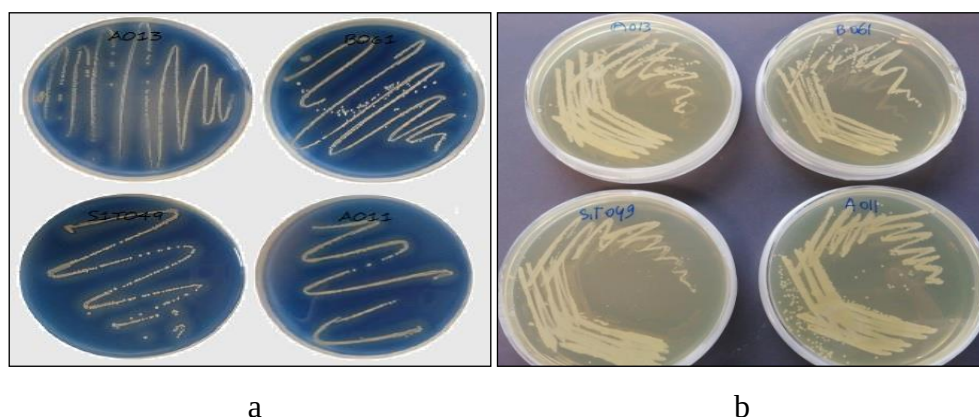
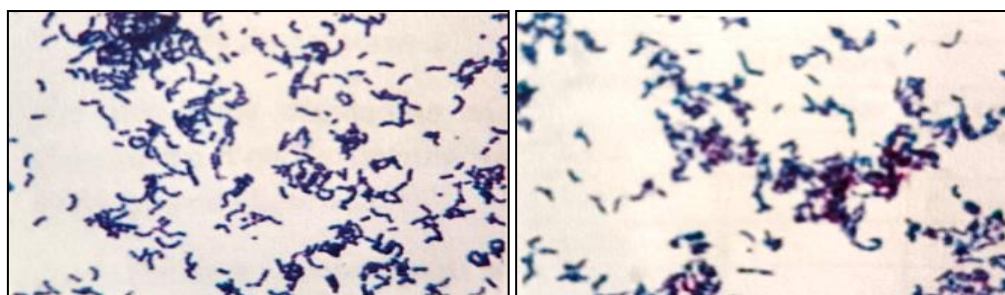


Figure 16 : Aspect macroscopique des souches sur milieu de Bleu d'Evans (a) et sur milieu TSA (b)

Tableau 12 : Caractéristiques culturelles des souches bactériennes sur milieu TSA après 72 h d'incubation

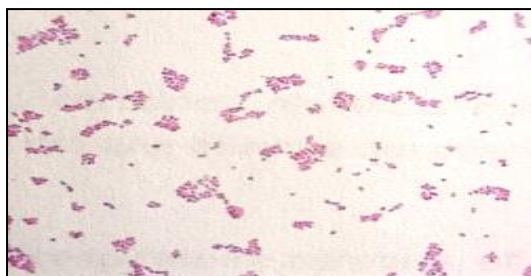
Souche	Forme	Couleur	Consistance	Bord	Opacité
A001	Circulaire	Beige	Muqueuse	Régulier	Opaque
A002	Filamenteuse	Blanche	Crémeuse	Irrégulier	Opaque
A006	Filamenteuse	Transparente	Poudreuse	Irrégulier	Translucide
A009	Filamenteuse	Gris-blanc	poudreuse	Irrégulier	Opaque
A011	Filamenteuse	Blanche	Poudreuse	Irrégulier	Opaque
A013	Filamenteuse	Blanche	poudreuse	Irrégulier	Opaque
B018	Filamenteuse	Blanche	Crémeuse	Irrégulier	Opaque
B061	Filamenteuse	Gris-blanc	Poudreuse	Irrégulier	Opaque
BAI1	Ponctiforme	Blanche	Crémeuse	Régulier	Opaque
E002	Ponctiforme	Blanche	Muqueuse	Régulier	Translucide
S001	Filamenteuse	Grise	poudreuse	Irrégulier	Opaque
S1T049	Filamenteuse	Blanc-beige	Poudreuse	Irrégulier	Opaque
S2T049	Irrégulière	Blanche	Muqueuse	Irrégulier	Opaque
T055	Circulaire	Jaune	Poudreuse	Régulier	Opaque
H001	Filamenteuse	Blanche	Crémeuse	Irrégulier	Opaque

Après les observations macroscopiques, les isolats ont été mis en observation microscopique en état fixé (coloration de *Gram*). Les résultats indiquent que les isolats présentent des formes cellulaires très variables. On trouve des actinobactéries avec un aspect filamenteux (A011, A002, A006, A009, B018, S001, A013, H001, B061, S1T049) aussi des formes de cocci (A001 et S2T049) et les autres en formes bacillaires de taille moyenne (Figure 17).



a : Cocci Gram⁺

b : Actinobactéries Gram⁺



c : Bacilles Gram⁻

Figure 17 : Observation microscopique des souches après coloration de Gram à Gx100

La coloration de Gram nous a révélé une prédominance des Gram⁺, avec un taux de 70 %. D'après les résultats obtenus par le test de décoloration du Bleu d'Evans sur un milieu liquide, les souches à Gram⁺ sont plus dégradantes que les souches à Gram⁻ avec un taux de décoloration > 85 % pour les souches à Gram⁺, contrairement aux souches à Gram⁻ qui sont moins dégradantes, soit un taux de décoloration < 75 % (Figure 18). Ainsi, quatre isolats d'actinobactéries (A011, A013, B061 et S1T049) ont montré une décoloration significative que nous allons par la suite identifier et tester leur potentiel de biodégradation des différents colorants choisis.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus par (**Öztürk et Abdullah, 2006**) qui a trouvé que les bactéries Gram⁺ ont une activité de dégradation importante sur les colorants azoïques plutôt que les bactéries Gram⁻. Donc, le taux de dégradation des colorants est différent d'un groupe bactérien à un autre. La paroi cellulaire rigide des bactéries Gram⁺ contient de nombreux radicaux négatifs servant de sites actifs qui, selon certains chercheurs (**Mameri et al., 1999 ; Selatnia et al., 2004**), présentent une forte affinité pour les groupements amines.

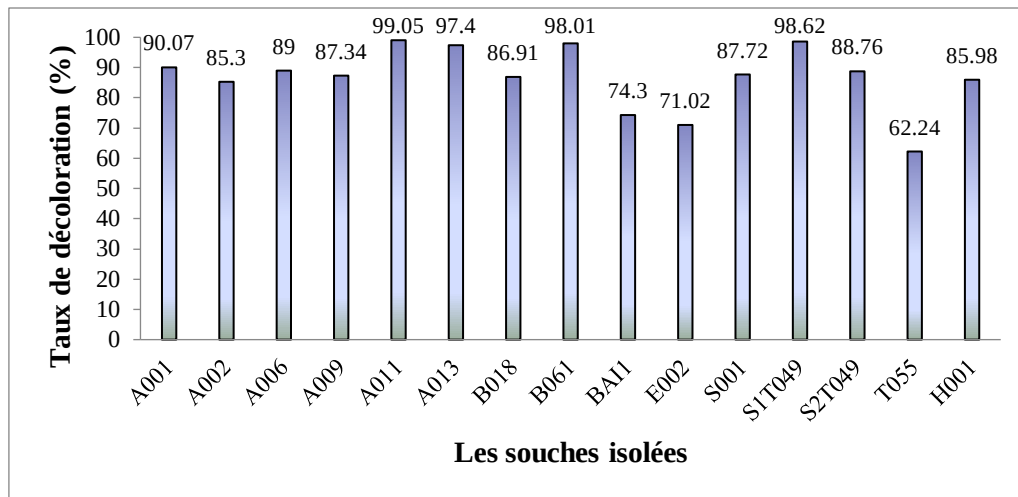


Figure 18 : Pourcentage de décoloration du Bleu d'Evans après 7 jours d'incubation

III.4. Identification des actinobactéries

L'explosion nucléotidique et la reconstruction phylogénétique, basée sur la séquence du gène de l'ARN 16S (Figure 19), indiquent que les quatre souches sélectionnées appartiennent toutes au genre *Streptomyces* (Actinobacteria ; Actinomycetia ; Streptomycetales ; Streptomycetaceae).

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses aérobies à coloration Gram positive, caractérisées par une structure de colonie complexe incluant des mycéliums ramifiés multinucléés, avec des différenciations entre les mycéliums aériens et du substrat ainsi que des structures reproductrices. Leur paroi cellulaire, composée notamment de peptidoglycane et d'acides mycoliques, peut influencer leur capacité à dégrader les colorants de plusieurs manières. Une paroi plus perméable favorise l'accès des enzymes de dégradation des colorants, facilitant ainsi leur dégradation (**Rahlwes et al., 2019**). De plus, les actinobactéries peuvent développer une résistance accrue aux conditions environnementales difficiles grâce à certains composés de leur paroi, leur permettant ainsi de maintenir leur activité métabolique de dégradation des colorants dans des environnements variés (**Preethi and Pathy, 2020**).

Sur la base de nos résultats, les souches A011, B061 et S1T049 peuvent être attribuées, respectivement, aux espèces *Streptomyces maritimus*, *Streptomyces mutabilis* et *Streptomyces ardesiacus*. La souche A013 qui est, phylogénétiquement, proche de l'espèce *Streptomyces ardesiacus* ne s'est regroupée avec aucune des espèces connues de *Streptomyces* et pourrait constituer une nouvelle espèce dans le genre *Streptomyces*.

Des recherches récentes indiquent que les actinobactéries; en particulier les espèces de *Streptomyces*, ont une grande capacité à décolorer les colorants azoïques. De plus, les

enzymes présentes dans les actinobactéries peuvent survivre dans des conditions extrêmes telles que le pH et la température (**Preethi and Pathy, 2020 ; Abdel-Monem et al., 2021 ; Reda et al., 2019**).

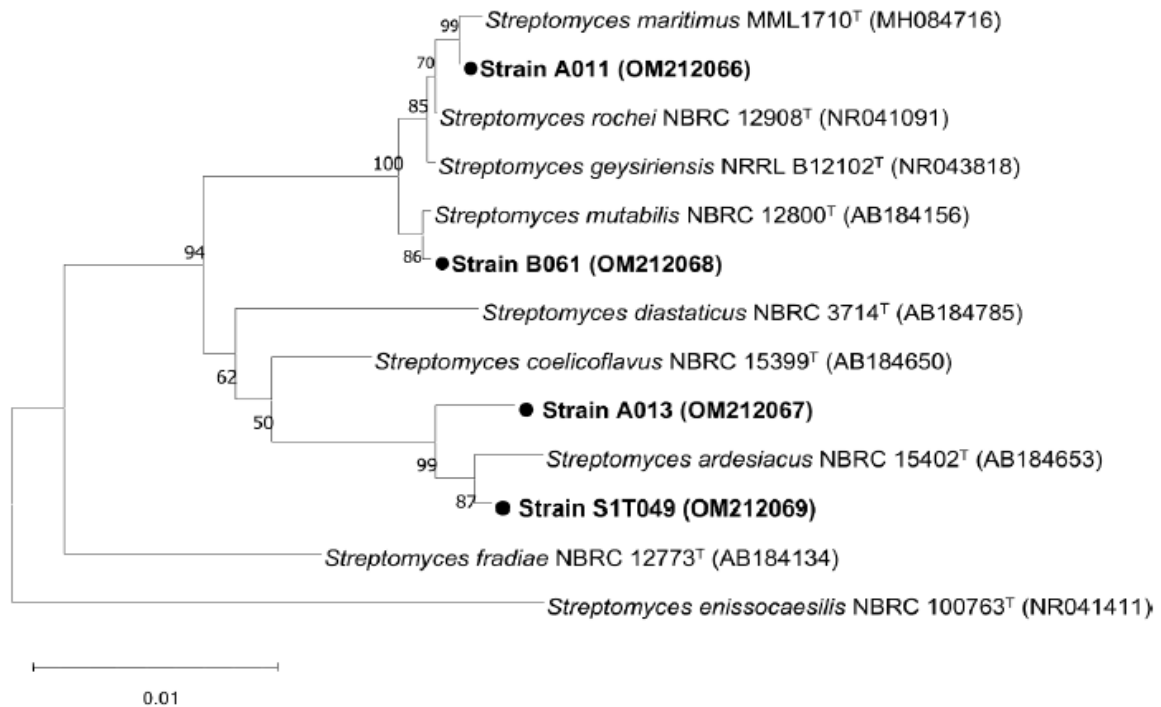


Figure 19 : Arbre simplifié montrant la position phylogénétique des quatre souches isolées de *Streptomyces* : A011, A013, B061 et S1T049.

L'histoire évolutive a été déduite sur la base des séquences d'ADNr 16S, en utilisant la méthode Neighbor-Joining avec un test bootstrap de 1000 répétitions. Les numéros d'accès pour les séquences d'ADNr 16S sont indiqués entre parenthèses. L'arbre optimal est affiché. Le pourcentage d'arbres répliqués dans lesquels les taxons associés se sont regroupés dans le test bootstrap (1000 répliqués) est indiqué à côté des branches (**Felsenstein, 1985**). L'arbre est dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branche dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance composite (**Tamura et Kumar, 2004**) et sont exprimées en nombre de substitutions de bases par site. Cette analyse a porté sur 13 séquences nucléotidiques. Toutes les positions ambiguës ont été supprimées pour chaque paire de séquences (option de suppression par paire). Il y avait un total de 1512 positions dans l'ensemble de données finales. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA11 (**Tamura et al., 2021**). L'arbre a été simplifié pour n'inclure que 9 souches de type pour des raisons de clarté ; l'analyse a porté sur un total de 756 souches, dont 752 souches types des différentes espèces du genre *Streptomyces*.

III.5. Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre, concernant l'isolement et le screening des bactéries dégradantes, lors de la dégradation du Bleu d'Evans dans un milieu solide, ont permis de sélectionner 15 souches. Nous avons pu établir des différences claires entre ces isolats en utilisant des caractéristiques morphologiques (macroscopique et microscopique).

La plupart des colonies qui se sont développées sur les boîtes de pétri appartenaient au genre d'actinobactéries, puisque les colonies étaient à croissance lente, pliées et avec des mycéliums aériens et possédants une odeur terreuse.

En faisant un test de décoloration sur un milieu liquide du Bleu d'Evans, quatre isolats d'actinobactéries (A011, A013, B061 et S1T049) ont montré une décoloration significative du milieu, avec, respectivement, des taux de (99,05, 97,4, 98,01, 98,62 %).

Enfin, une identification de confirmation du genre a été faite par l'exploitation nucléotidique et la reconstruction phylogénétique, basée sur la séquence du gène de l'ARN 16S, indiquant que les quatre souches sélectionnées appartiennent toutes au genre *Streptomyces* (*Streptomyces maritimus*, *Sreptomyces mutabilis* et *Streptomyces ardesiacus*).

Références

- Abdel-Monem, M.O., El Awady, M.E., Ghada, E.M., El-shall, F.N., Hassan, M.G., 2021. Screening and optimization of environmental parameters for maximum decolorization of reactive orange 122 Azo-dye by *Streptomyces* sp (A5). Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. 13(1), 49-60. <https://doi.org/10.21608/eajbsg.2021.176116>
- Amrani, S., 2010. Caractéristiques symbiotiques et génotypiques des rhizobia associés à *Acacia Saligna* (Labill.) Wendl. en Algérie et potentiel d'utilisation pour la production d'inoculants destinés aux pépinières (Doctoral dissertation, Alger).
- Felsenstein, J., 1985. Phylogenies and the comparative method. The American Naturalist, 125(1), 1-15.
- Mameri, N., Boudries, N., Addour, L., Belhocine, D., Lounici, H., Grib, H., Paus, A., 1999. Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass. Water research. 33(6), 1347-1354.
- Öztürk, A., Abdullah, M.I., 2006. Toxicological effect of indole and its azo dye derivatives on some microorganisms under aerobic conditions. Sci. Total Environ. 358(1-3), 137-142.
- Preethi, S., Pathy, R., 2020. Exploring prospective forested wetland—actinomycetes for biodeterioration of genotoxic textile azo dyes. Indian J. Exp. Biol. 58, 344-354.
- Rahlwes, K.C., Sparks, I.L., Morita, Y.S., 2019. Cell walls and membranes of Actinobacteria. *Bacterial Cell Walls and Membranes*. 417-469.
- Reda, F.M., El-Mekkawy, R.M., Hassan, N.S., 2019. Detoxification and bioremediation of sulfa drugs and synthetic dyes by *Streptomyces mutabilis* A17 laccase produced in solid state fermentation. J. Pure Appl. Microbiol. 13(1), 85-96. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.1.09. Article 5481>.
- Selatnia, A., Boukazoula, A., Kechid, N., Bakhti, M.Z., Chergui, A., Kerchich, Y., 2004. Biosorption of lead (II) from aqueous solution by a bacterial dead *Streptomyces rimosus* biomass. Biochem. Eng. J. 19(2), 127-135.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(30), 11030-11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA 11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Mol. Biol. Evol. 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

Chapitre IV

Facteurs influençant la dégradation des colorants azoïques

IV.1. Introduction

Ce chapitre a pour principal objectif d'analyser la décoloration du Bleu d'Evans par les *Streptomyces* isolés. Cette analyse s'effectuera en utilisant la spectrophotométrie UV-Visible pour quantifier le changement d'absorbance du milieu de culture par rapport aux échantillons de contrôle, à différentes étapes d'incubation, en se basant sur la longueur d'onde maximale (λ_{max}) du colorant. En outre, il vise à explorer l'impact de divers paramètres physicochimiques, notamment la température, le pH initial du milieu, la vitesse d'agitation, la concentration initiale du colorant, la source de carbone, la teneur en sel et la présence d'ions métalliques sur l'efficacité du processus de décoloration. Dans cette optique, une série d'expériences ont été conduites en se concentrant sur le colorant azoïque Bleu d'Evans.

VI.2. Etude de la décoloration du Bleu d'Evans par les actinobactéries identifiées

La décoloration du Bleu d'Evans par les quatre souches identifiées a été suivie durant sept jours par spectrophotométrie. Les résultats obtenus (Figure 20) indiquent une augmentation rapide du taux de décoloration avec la période d'incubation. Nous avons observé une efficacité de décoloration quasi-identique des souches au cours de la même période d'incubation, soit 7 jours, avec A011 (98,5 %), A013 (97,29 %), B061 (98,33 %) et S1T049 (97,75 %) et aucune décoloration ne s'est produite pour le témoin non inoculé.

Au bout de 24 h, on remarque une augmentation rapide du taux de décoloration, atteignant respectivement 50,12 %, 29,83 %, 47,33 % et 40,16 % pour les souches A011, A013, B061 et S1T049. Pendant cette période, la croissance bactérienne s'accélère rapidement, ce qui entraîne une augmentation exponentielle du nombre de cellules bactériennes. Cette phase est caractérisée par une multiplication cellulaire rapide et une augmentation rapide de la population bactérienne.

Après 6 jours d'incubation, les réserves nutritives commencent à s'épuiser, ce qui entraîne l'atteinte du taux de décoloration maximal, lequel reste constant par la suite.

Les différentes données expérimentales obtenues indiquant clairement que la période d'incubation constitue un facteur essentiel dans le processus de décoloration. Suivant **Yang et al. (2009)**, il existe une grande variabilité dans la période d'incubation optimale à laquelle une décoloration efficace a lieu selon les souches testées. De plus, **Sideeg et al. (2020)** ont rapporté que la décoloration augmente avec l'incrément de temps de la période d'incubation, ce qui contribue à augmenter la biomasse bactérienne.

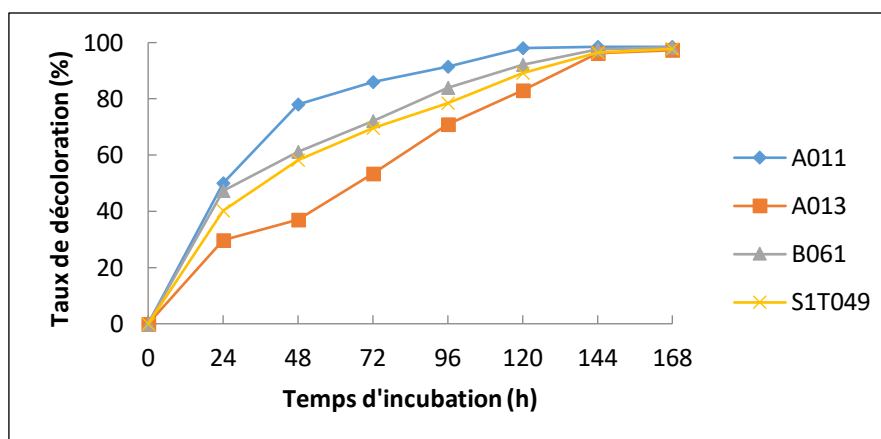


Figure 20 : Variation du taux de décoloration du BE en fonction du temps d'incubation, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

VI.3. Optimisation des paramètres influençant la dégradation du Bleu d'Evans

VI.3.1. Influence de la vitesse d'agitation sur l'efficacité de la décoloration

L'effet de la vitesse d'agitation du milieu sur la décoloration du Bleu d'Evans a été étudié à différentes valeurs (0, 80, 100, 120, 140 tr/min) et en fonction du temps dans un incubateur-agitateur.

D'après les figures (21 - 24), les résultats de décoloration les plus élevés étaient supérieurs à 97 %, sous une vitesse de 140 tr/min et 7 jours d'incubation pour les souches A011, A013, B061 et S1T049. Nous notons, toutefois, une faible décoloration aux vitesses de 80, 100, 120 tr/min pour toutes les souches de *Streptomyces*.

Dans les conditions statiques et après 7 jours d'incubation, des pourcentages de 37, 34, 40,1 et 30 % ont été notés pour, respectivement, les souches A011, A013, B061 et S1T049. L'incubation statique du milieu a, donc, conduit à une très faible décoloration, comparativement aux conditions d'agitation.

Ainsi, nos résultats sont en accord avec ceux de **Mane et al. (2008)** ; *Streptomyces krainskii* SUK-5 n'a pas décoloré le Bleu Marine Rx dans les conditions statiques, alors qu'une décoloration de 95,33 % a été possible dans les conditions d'agitation, après 24 h d'incubation.

Selon **Varjani et Upasani (2017)**, le métabolisme microbien est influencé par l'apport d'oxygène sous agitation. Différents micro-organismes nécessitent des conditions différentes telles que les conditions aérobie, anaérobie et semi-anaérobie. L'agitation joue un rôle dans l'aération/l'apport d'oxygène. L'oxygénation peut être améliorée par agitation.

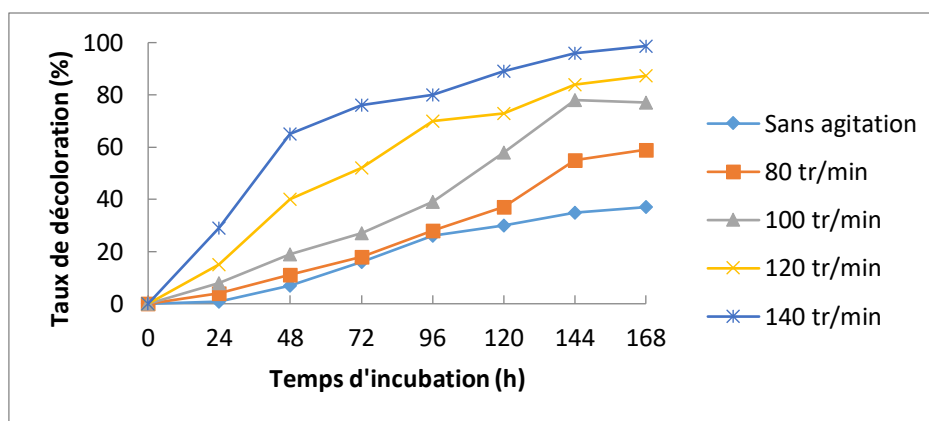


Figure 21 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces maritimus* A011 en fonction du temps et de la vitesse d'agitation, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et un pH = 7

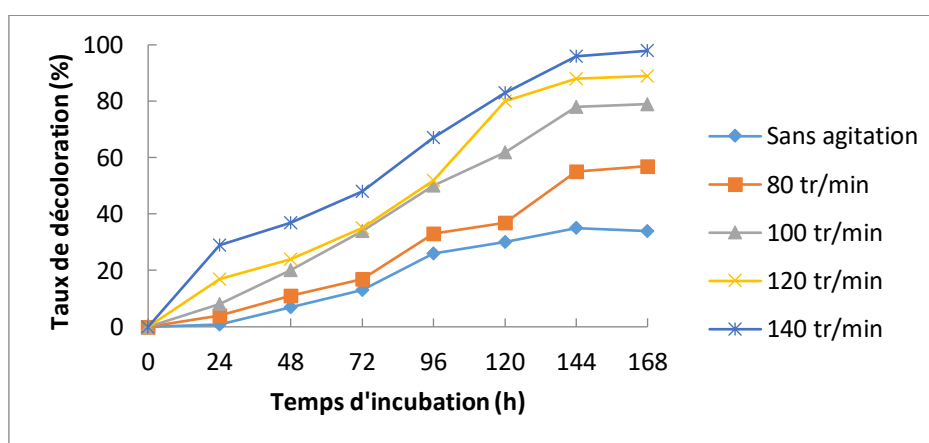


Figure 22 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces* sp.A013 en fonction du temps et de la vitesse d'agitation, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et un pH = 7

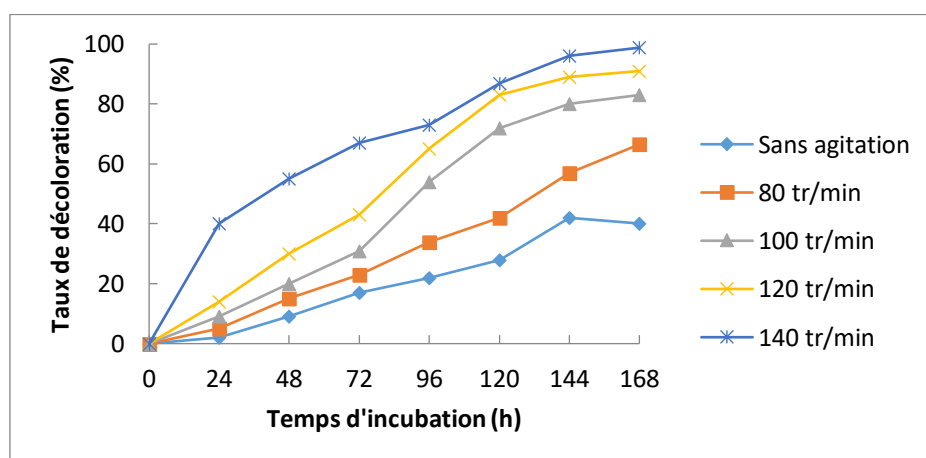


Figure 23 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces mutabilis* B061 en fonction du temps et de la vitesse d'agitation, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et un pH = 7

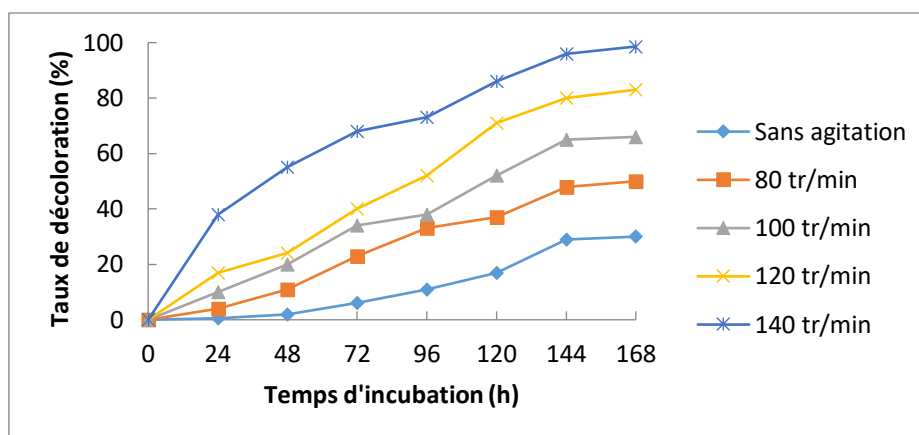


Figure 24 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces ardesiacus* S1T049 en fonction du temps et de la vitesse d'agitation, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et un pH = 7

VI.3.2. Influence de la température sur l'efficacité de la décoloration

La température constitue un facteur primordial dans tout processus associé à la vitalité bactérienne (Saratale et al., 2011). Les figures 25 - 28 montrent l'efficacité de décoloration de 50 mg/L du Bleu d'Evans par les souches d'actinobactéries testées à différentes températures d'incubation (4, 20, 30, 40 et 50 °C) en fonction du temps. Les résultats indiquent un niveau élevé de décoloration (98,7, 97,6, 98,62 et 97,69 %) à 30 °C et (96, 98,45, 97,91 et 98,00 %) à 40 °C pendant 7 jours d'incubation pour, respectivement, les souches A011, A013, B061 et S1T049.

L'augmentation de la température au-delà de 40 °C entraîne une diminution des taux de décoloration, soit 40,45, 76,08, 44,33 et 80,08 % à 50 °C pour, respectivement, les souches A011, A013, B061 et S1T049. De même que pour une température de 20 °C, nous avons observé des taux de décoloration de 87,25, 82,75, 85,33 et 80,29 % pour, respectivement, les souches A011, A013, B061 et S1T049. En effet, les taux de décoloration enregistrés pour les températures de 30 et 40 °C sont plus importants que ceux trouvés pour 20 et 50 °C. Par conséquent, nous déduisons que la température optimale est comprise entre 30 et 40 °C.

Selon Endo et al. (2003), il a été rapporté que la meilleure décoloration était obtenue par *Streptomyces* sp à 40 °C. Alors que, pour le Reactive Orange 16, l'isolat de *Nocardioopsis alba* a montré une capacité de décoloration importante à 30 °C (Sugumar et Thangam, 2012).

L'étude de Mane et al. (2008) considère que l'isolat de *Streptomyces krainskii* SUK-5 dégrade totalement (100 %) le Bleu réactif 59 à 30 °C.

De plus, il a été rapporté qu'à des températures plus élevées, une faible décoloration était obtenue pour les espèces microbiennes en raison de la désactivation thermique des enzymes responsables de la décoloration, donc, inhibition de la croissance microbienne (**Chang et Kuo, 2000 ; Saratale et al., 2009 ; Abdel-Monem et al., 2021 ; Rajendran et al., 2021**).

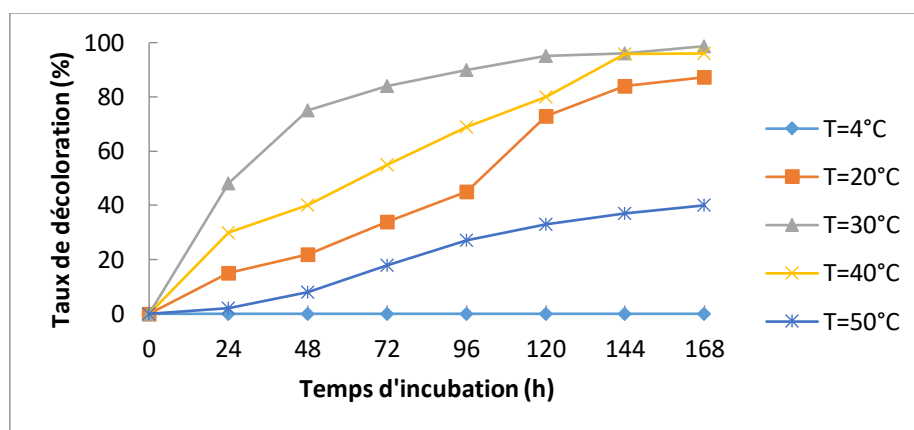


Figure 25 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces maritimus* A011 en fonction du temps et de la température, avec [BE] = 50 mg/L, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

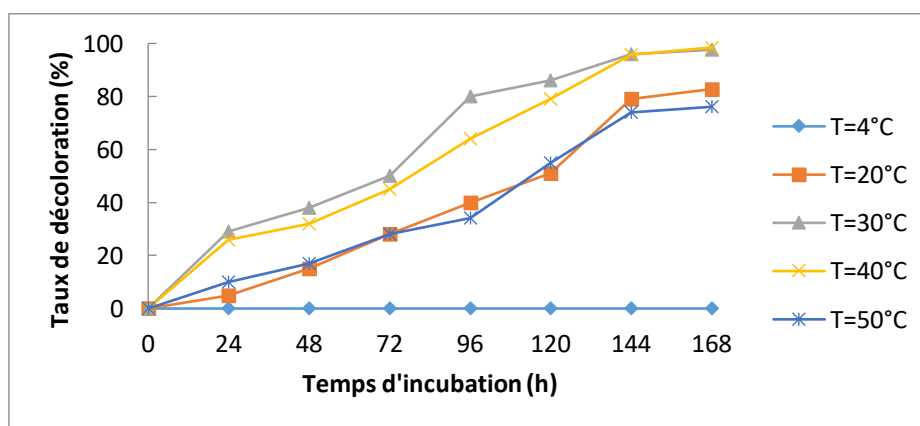


Figure 26 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces* sp.A013 en fonction du temps et de la température, avec [BE] = 50 mg/L, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

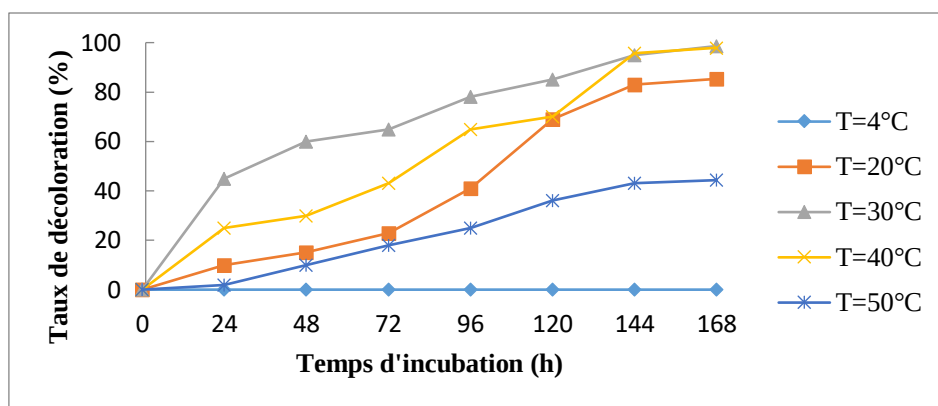


Figure 27 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces mutabilis* B061 en fonction du temps et de la température, avec [BE] = 50 mg/L, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

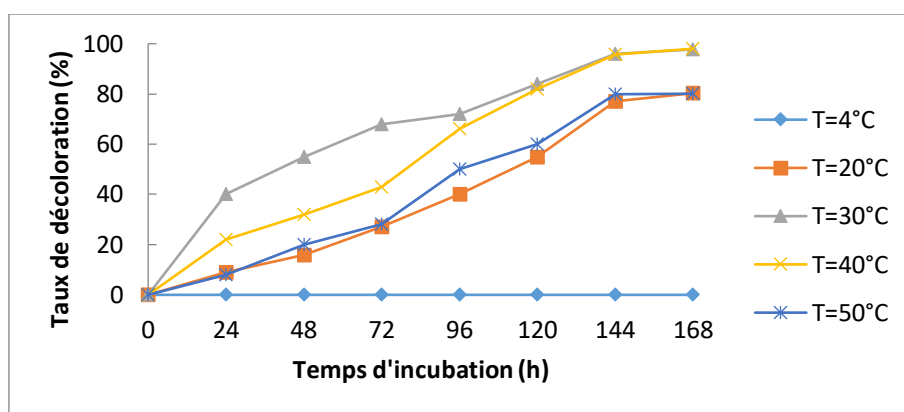


Figure 28 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces ardesiacus* S1T049 en fonction du temps et de la température, avec [BE] = 50 mg/L, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

VI.3.3. Influence du pH initial sur l'efficacité de la décoloration

L'effet du pH sur la décoloration du Bleu d'Evans a été étudié à différentes valeurs de pH (5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 et 10) en fonction du temps. Pendant toute la période d'incubation, et comme le montre les figures (29 - 32), les résultats de décoloration les plus élevés sont supérieurs à 92 %, observés à pH (7,0, 8,0 et 9,0) pour les souches A011, A013, B061 et S1T049. Ces résultats indiquent que les souches peuvent être utilisées pour traiter les colorants contenus dans les eaux usées à des plages de pH variables, comme cela a été suggéré par **Li et al. (2021)**. Cependant, le potentiel de décoloration est faible aux pH (5,0, 6,0 et 10) pour toutes les souches de *Streptomyces*. En revanche, aucun processus de décoloration significatif n'a été observé (3,12 et 1,16 %) à pH 10 pour, respectivement, les souches A013 et S1T049.

Il a été rapporté que le pH optimal de l'activité de dégradation des souches d'actinobactéries se situe fréquemment à 7,0 ou à une valeur légèrement alcaline. D'autre part, à des valeurs de pH fortement acides ou fortement alcalines, le taux de décoloration diminue rapidement en raison des changements de structure chimique du colorant azoïque par protonation ou déprotonation des liaisons azoïques (Hsueh et al., 2008 ; Rahman et al., 2019 ; Rajendran et al., 2021). Chittal et al. (2019) ont découvert que la souche actinobactérienne VITVAMB1 était capable de maintenir un niveau élevé de décoloration du Reactive Orange-16 à des pH de 7,0 et 8,0. De même, une décoloration maximale du Reactive Blue-59 a été observée à un pH de 8,0 par *Streptomyces krainskii* SUK-5 (Mane et al., 2008).

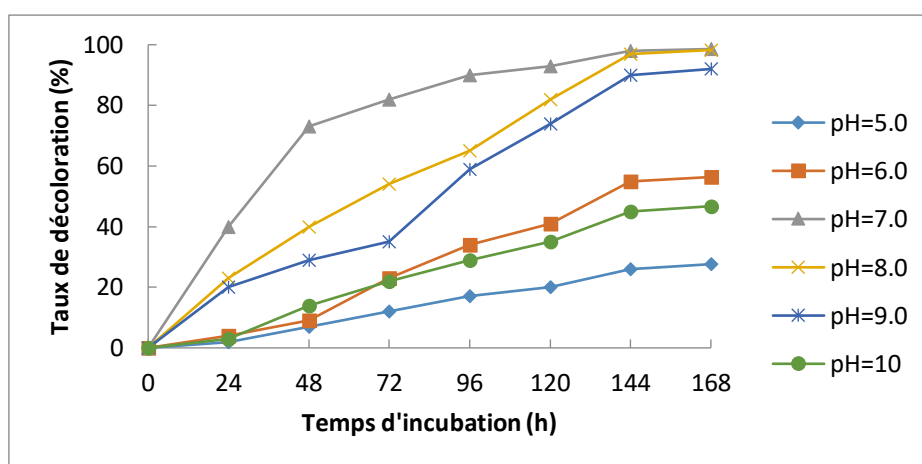


Figure 29 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces maritimus* A011 en fonction du temps et du pH, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30°C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

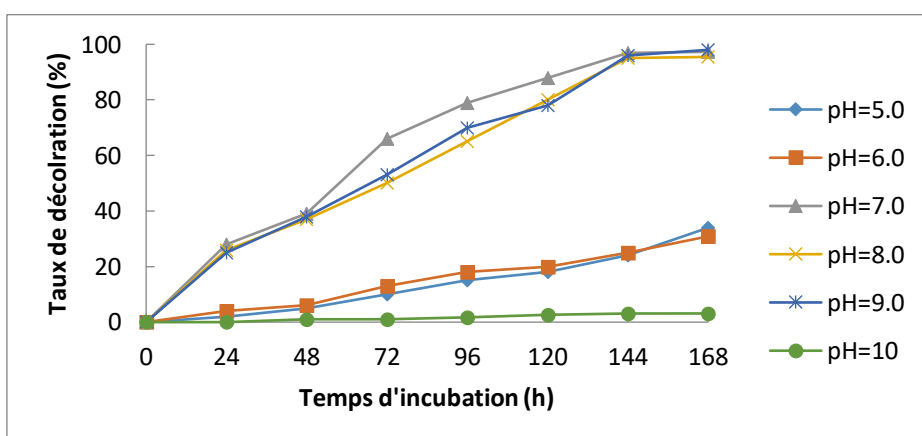


Figure 30 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces* sp. A013 en fonction du temps et du pH, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

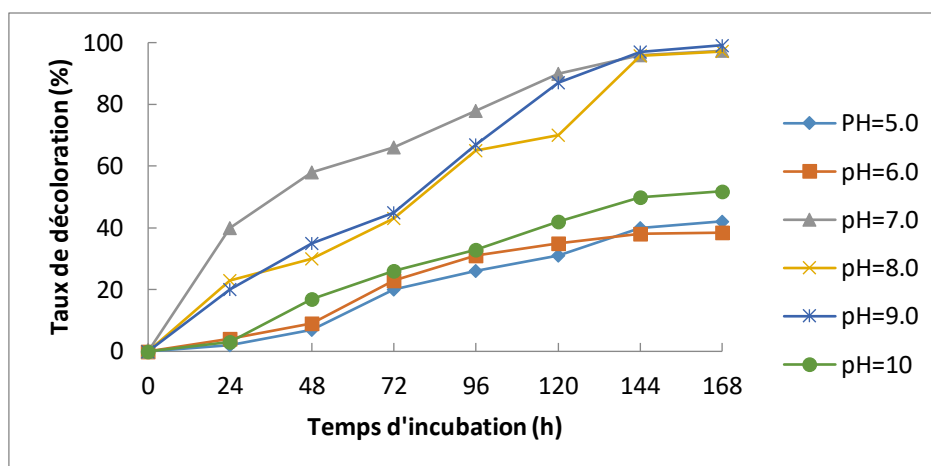


Figure 31 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces mutabilis* B061 en fonction du temps et du pH, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

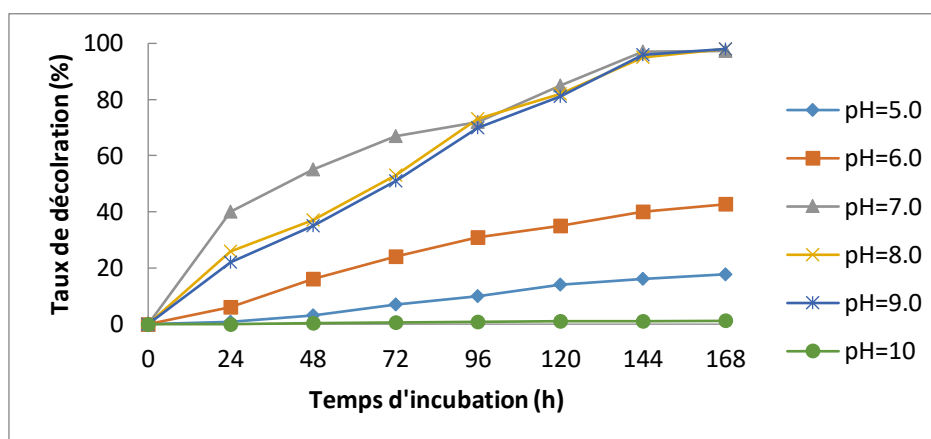


Figure 32 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces ardesiacus* S1T049 en fonction du temps et du pH, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30° et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

VI.3.4. Influence de la concentration initiale du colorant sur l'efficacité de décoloration

La décoloration du Bleu d'Evans a été étudiée à différentes concentrations du colorant (50, 60, 80, 100, 120 mg/L) en fonction du temps. Les résultats obtenus (Figures 33 - 36) ont démontré que le taux de décoloration le plus élevé (>97 %) a été observé à la plus faible concentration (50 mg/L) pour les quatre souches isolées (A011, A013, B061 et S1T049). Une diminution progressive du taux de décoloration a été observée aux concentrations de 60, 80 et 100 mg/L. Aucun processus de décoloration significatif n'a été observé à la concentration la plus élevée de 120 mg/L pour toutes les souches. Il ressort clairement de l'observation que le pourcentage de décoloration diminue avec l'augmentation de la concentration du colorant.

Ainsi, il apparaît que plus la concentration est faible, plus l'efficacité de la décoloration est élevée et vice-versa.

Le même effet a été observé pour *Streptomyces* DJP15, pour laquelle une décoloration maximale de 76,66 % s'est produite à la plus faible concentration (50 mg/L) pour le colorant Bleu réactif sous 48 h d'incubation (**Pillai, 2017**). De même, pour la souche actinobactérienne VITVAMB1, une décoloration maximale (95,07 %) du Reactive Orange-16 a été observée à 50 mg/L, et une faible décoloration a été notée à 300 mg/L avec 57 % (**Chittal et al., 2019**).

Ces résultats indiquent que le processus de décoloration est fortement influencé par la concentration initiale du colorant, la vitesse de décoloration diminuant avec une augmentation de la concentration du colorant. La raison peut être due au fait que la forte concentration du colorant est naturellement toxique pour la plupart des organismes, et cette toxicité peut inhiber l'activité microbienne (**Khehra et al., 2005 ; Kalme et al., 2007 ; Chittal et al., 2019**). En revanche, **Kalyani et al. (2009)** ont observé que les colorants azoïques contenant des groupes d'acide sulfonique (SO_3H) sur leurs cycles aromatiques inhibent fortement l'activité des micro-organismes aux fortes concentrations du colorant.

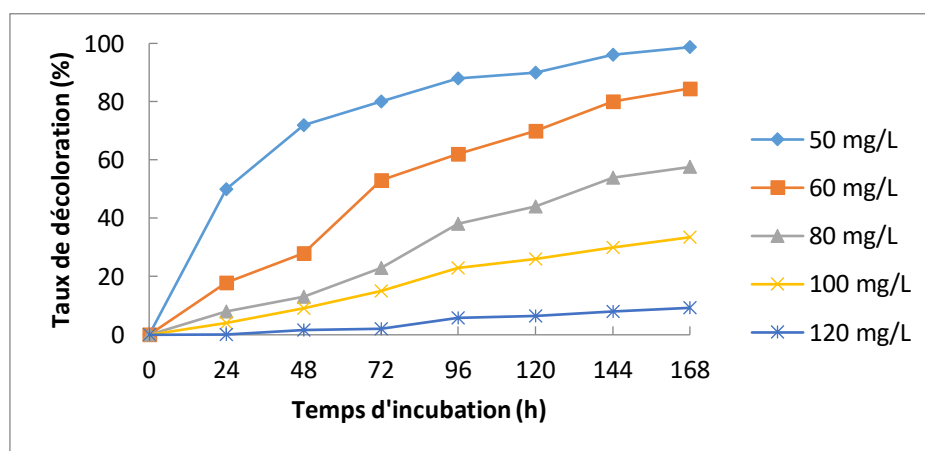


Figure 33 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces maritimus* A011 en fonction du temps et de la concentration initiale du BE pour T = 30 °C et pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

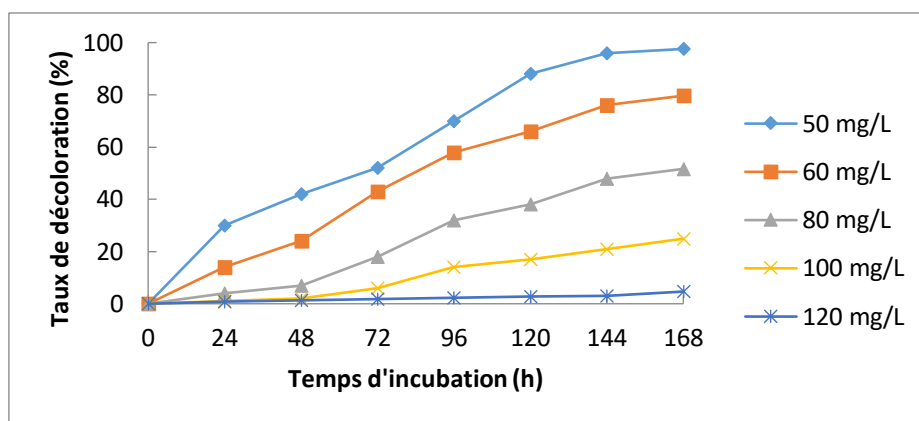


Figure 34 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces* sp.A013 en fonction du temps et de la concentration initiale du BE pour pH = 7 et T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

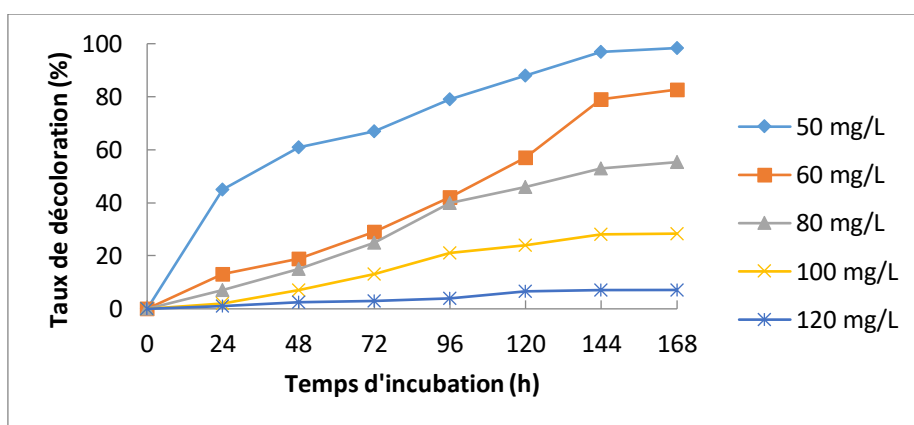


Figure 35 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces mutabilis* B061 en fonction du temps et de la concentration initiale du BE pour pH = 7 et T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

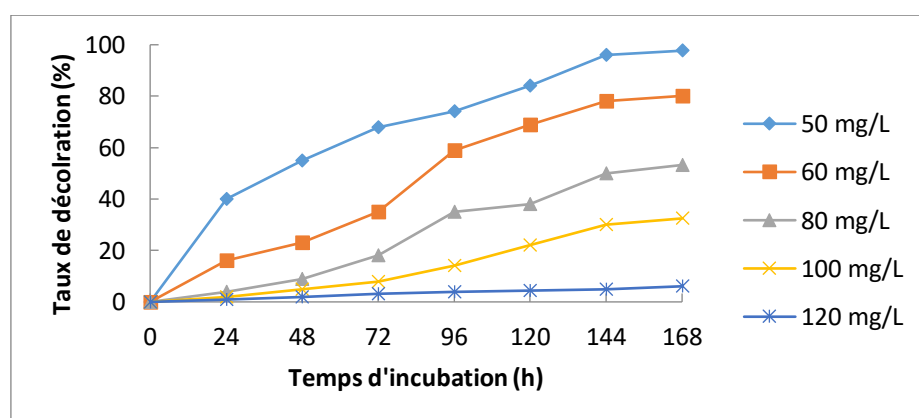


Figure 36 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces ardesiacus* S1T049 en fonction du temps et de la concentration initiale du BE pour pH = 7 et T = 30 °C et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

VI.3.5. Influence de la source du carbone sur l'efficacité de la décoloration

L'effet de la source du carbone sur la décoloration du Bleu d'Evans a été étudié en présence du glucose, saccharose, fructose et galactose. Ces nutriments ont été ajoutés séparément à raison de 2 g/L.

Les tests de décoloration effectués sans aucune source de carbone supplémentaire (Figures 37 - 40) ont révélé que 60,76, 46,60, 53,81 et 50,83 % d'élimination de la couleur du colorant ont été obtenus pour, respectivement, les souches A011, A013, B061 et S1T049. Le pourcentage de décoloration le plus élevé a été obtenu avec du glucose (2 g/L) comme source de carbone après 7 jours d'incubation. De plus, un bon potentiel de décoloration a été observé avec l'ajout de la même concentration de saccharose, fructose et galactose ; alors qu'avec la souche B061, nous avons obtenu, respectivement, 7,45 et 23,53 % de décoloration pour le saccharose et le galactose. **Reda et al. (2019)** ont révélé que l'activité enzymatique de la laccase de *Streptomyces mutabilis* A17, la plus élevée, était obtenue avec l'ajout du glucose (1 % p/v). Plusieurs études ont rapporté que l'ajout d'une source de carbone dans le milieu était essentiel au processus de décoloration et à la croissance des micro-organismes car les colorants sont déficients en sources de nutriments (**Saratale et al., 2009 ; Lade et al., 2012 ; Lalnunhlmi et al., 2016 ; Guo et al., 2020**). De plus, il est important de prendre en compte la quantité de la source du carbone, car elle doit être suffisante pour répondre aux exigences de croissance microbienne et obtenir une décoloration (**Solis et al., 2012**).

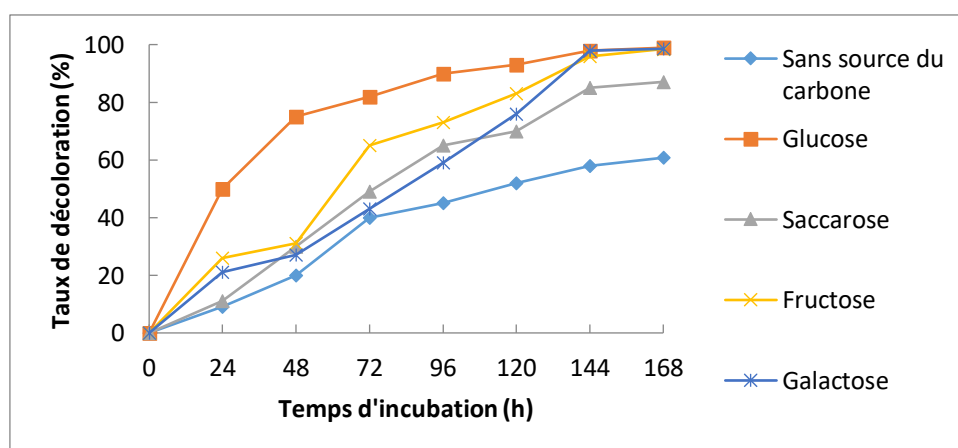


Figure 37 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces maritimus* A011 en fonction du temps et de la source du carbone, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

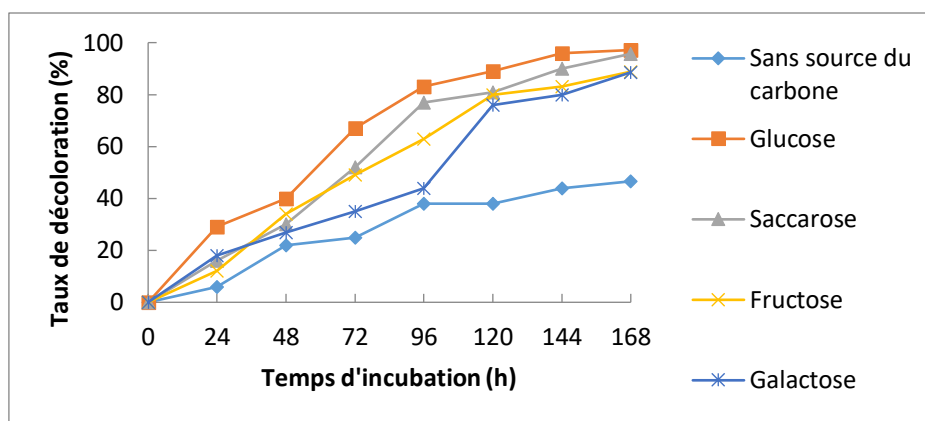


Figure 38 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces* sp.A013 en fonction du temps et de la source du carbone, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

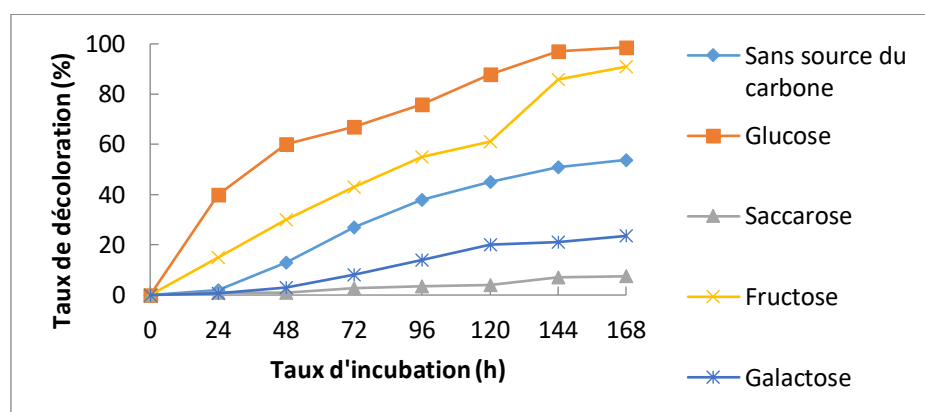


Figure 39 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces mutabilis* B061 en fonction du temps et de la source du carbone, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

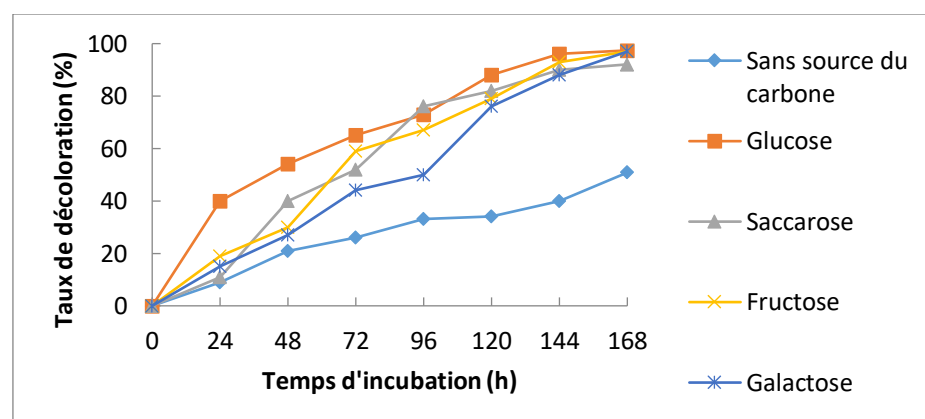


Figure 40 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces ardesiacus* S1T049 en fonction du temps et de la source du carbone, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

VI.3.6. Influence de la concentration en sel sur l'efficacité de la décoloration

Les figures (41 - 44) montrent l'influence de la concentration en NaCl variant de 0 à 1,25 mol/L sur l'efficacité de décoloration du Bleu d'Evans (50 mg/L) en fonction du temps.

Les résultats indiquent que dans le traitement en présence de *Streptomyces* sp, souches A011, A013 et S1T049, plus de 90 % de décoloration ont été enregistrés à différentes concentrations de sel (0, 0,25, 0,5, 0,75 et 1 mol/L), après 7 jours d'incubation. Le même effet a été observé avec *Streptomyces* sp. B061 à (0, 0,25 et 0,5 mol/L) de sel. Cependant, la concentration saline la plus élevée de 1,25 mol/L a montré une diminution progressive du potentiel de décoloration (65,32, 52,46, 40,05 et 58,68 %) par les souches A011, A013, B061 et S1T049, respectivement. Il a été rapporté que les concentrations les plus élevées en NaCl inhibent l'activité, la croissance et la survie microbiennes (Zhuang et al., 2020). Cependant, certaines souches peuvent se développer et prospérer dans des environnements à haute teneur en sel et pourraient, donc, être utilisées pour le traitement des effluents contenant des colorants avec des quantités substantielles de sels (Khalid et al., 2008 ; Chen et al., 2011 ; Ogugbue et al., 2011).

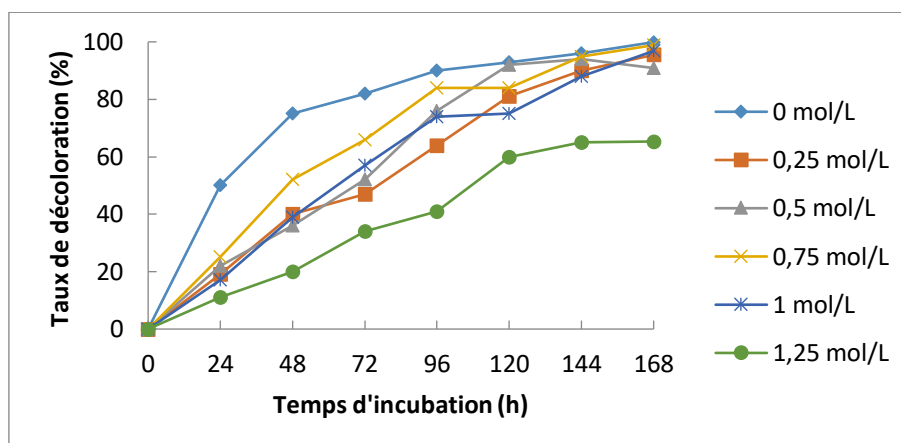


Figure 41 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces maritimus* A011 en fonction du temps et de la concentration en NaCl, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

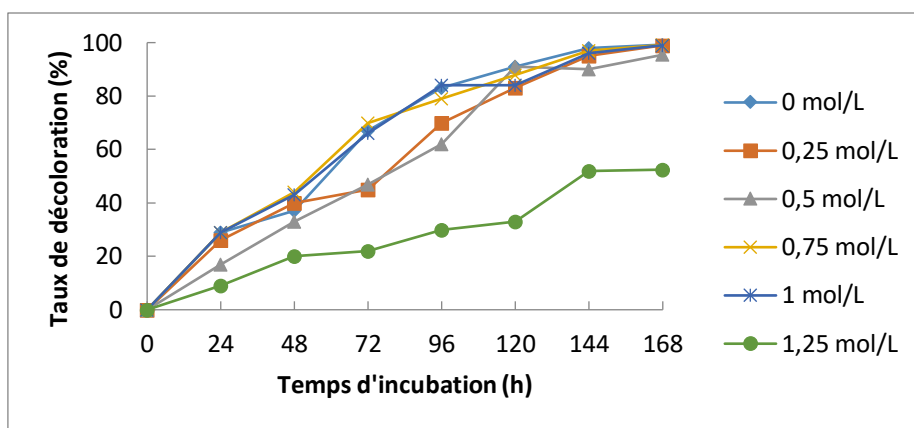


Figure 42 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces* sp.A013 en fonction du temps et de la concentration en NaCl, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

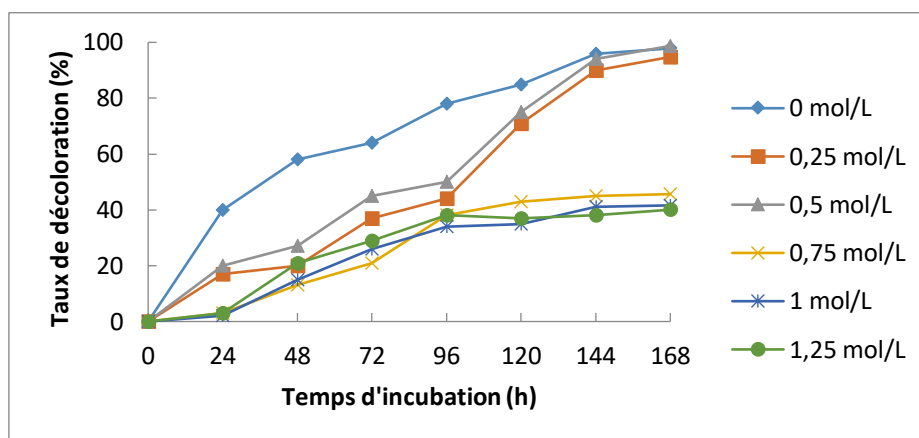


Figure 43 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces mutabilis* B061 en fonction du temps et de la concentration en NaCl, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

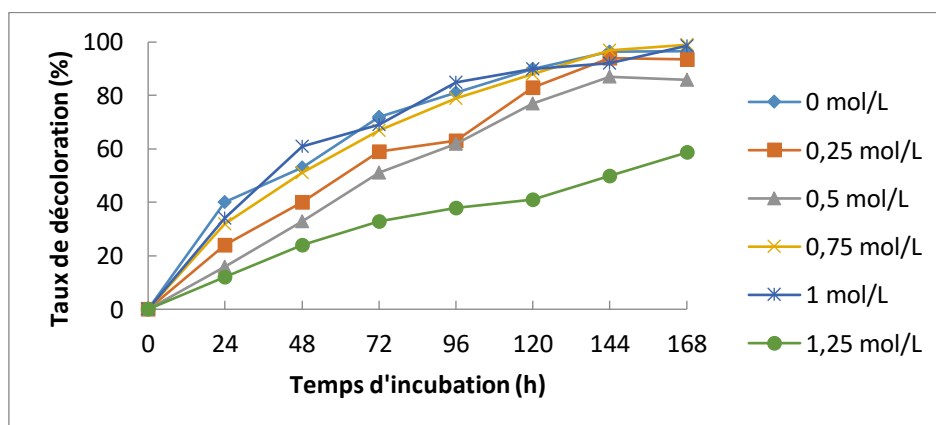


Figure 44 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces ardesiacus* S1T049 en fonction du temps et de la concentration en NaCl, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

VI.3.7. Influence des ions métalliques sur l'efficacité de la décoloration

Dans cette étude, nous avons également examiné le potentiel de décoloration après l'ajout de divers ions métalliques (Mg^{2+} , Li^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+}) à une concentration de 2 mM. Comme le montre les figures (45 - 48), plus de 94 % de décoloration ont été enregistrés avec l'ajout de Mg^{2+} et Li^{2+} pour toutes les souches testées. Cependant, aucune décoloration significative n'a été observée avec Zn^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+} . Par exemple, la décoloration de l'Acide Orange 7 par *Enterococcus faecalis* ST5 a été fortement inhibée par le Cd^{2+} (1 mM). En revanche, l'ajout de Mg^{2+} (1 mM) a augmenté le potentiel de décoloration (Zhuang et al., 2020). De plus, la présence de Zn^{2+} et de Hg^{2+} à une concentration de 5 mM a inhibé la décoloration du Remazol orange par *P. aeruginosa* BCH, mais Mg^{2+} a montré l'effet bénéfique sur la décoloration à la même concentration (Jadhav et al., 2012). Ces résultats indiquent que le type d'ions métalliques et leur concentration sont, également, des facteurs importants affectant la décoloration des colorants, car des concentrations élevées de métaux peuvent complètement inactiver les enzymes microbiennes, ce qui diminue le taux de décoloration (Lin-Na et al., 2011 ; Jadhav et al., 2012 ; Zhuang et al., 2020).

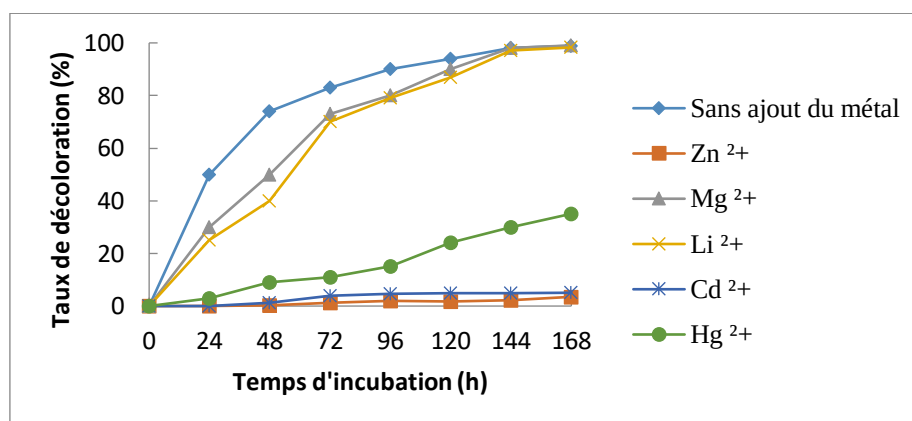


Figure 45 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces maritimus* A011 en fonction du temps et des ions métalliques, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

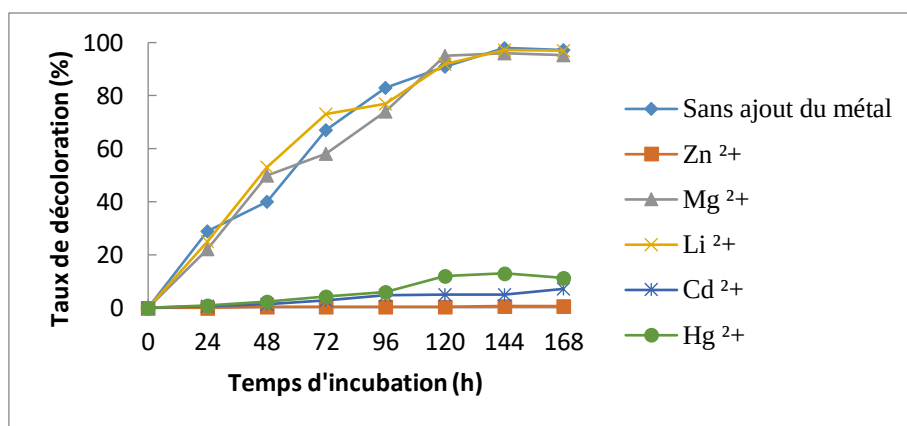


Figure 46 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces* sp.A013 en fonction du temps et des ions métalliques, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

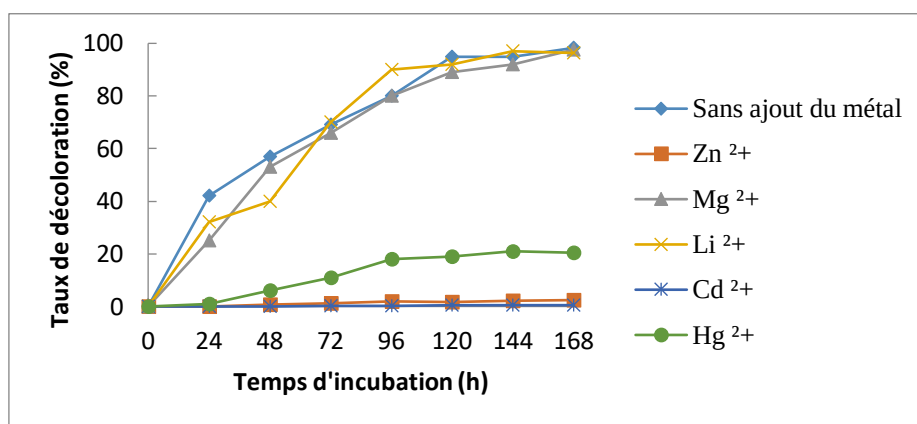


Figure 47 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces mutabilis* B061 en fonction du temps et des ions métalliques, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

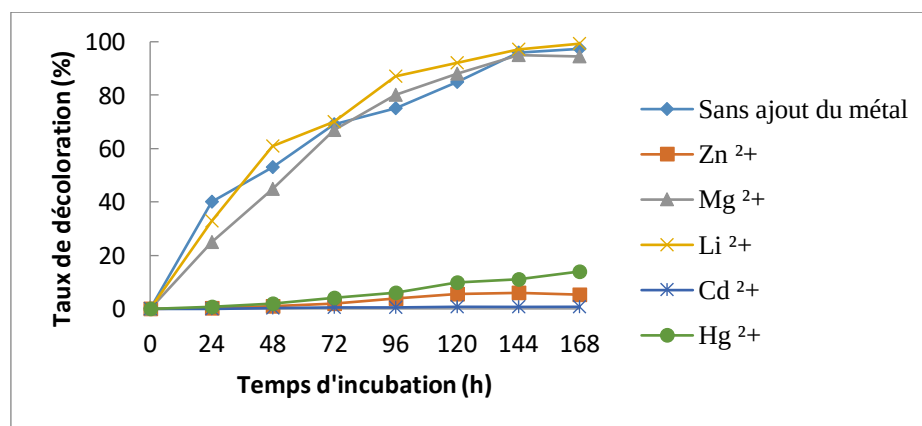


Figure 48 : Pourcentage de décoloration du BE par *Streptomyces ardesiacus* S1T049 en fonction du temps et des ions métalliques, avec [BE] = 50 mg/L, T = 30 °C, pH = 7 et une vitesse d'agitation = 140 tr/min

VI.4. Conclusion

Cette étude a démontré que plusieurs facteurs peuvent influencer le potentiel de dégradation des *Streptomyces* isolées. Tout d'abord le temps d'incubation a un impact significatif sur la dégradation du colorant, avec une amélioration de l'élimination au fil du temps. De même, une augmentation de la vitesse d'agitation favorise également la dégradation du colorant.

La température est un autre paramètre crucial, car elle peut influencer les processus métaboliques des *Streptomyces*. Les isolats ont montré une capacité de décoloration importante à des températures optimales (30 - 40 °C). De plus, des variations du pH peuvent, également, influencer le potentiel de dégradation, avec une plage optimale autour de 7,0 à 8,0.

L'étude a, également, révélé que l'ajout de petites quantités de glucides dans le milieu de culture stimule la dégradation du colorant par les *Streptomyces*. Cela peut être dû à l'utilisation des glucides comme source de carbone et d'énergie pour les bactéries.

En ce qui concerne les conditions environnementales, les fortes concentrations de colorant, la salinité et la présence de certains ions métalliques dans le milieu de culture non que peu affecté le potentiel de dégradation des souches. Cela suggère que les *Streptomyces* isolées dans cette étude ont une certaine résistance à ces facteurs et peuvent être potentiellement utilisées dans des applications d'élimination des colorants.

En combinant tous ces facteurs, cette étude a réussi à atteindre une élimination de l'ordre de 97 % de la concentration initiale en Bleu d'Evans (50 mg/L), démontrant le fort potentiel des souches isolées pour la dégradation de ce colorant. Ces résultats pourraient être pertinents pour le développement de méthodes plus écologiques et durables pour le traitement des eaux contenant des colorants industriels.

Références

- Abdel-Monem, M.O., El Awady, M.E., Ghada, E.M., El-shall, F.N., Hassan, M.G., 2021. Screening and optimization of environmental parameters for maximum decolorization of reactive orange 122 Azo-dye by *Streptomyces* sp (A5). Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. 13(1), 49-60. <https://doi.org/10.21608/eajbsg.2021.176116>.
- Chang, J.S., Kuo, T.S., 2000. Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. Bioresour. Technol. 75(2), 107-111.
- Chen, C.Y., Chang, J.C., Chen, A.H., 2011. Competitive biosorption of azo dyes from aqueous solution on the templated crosslinked-chitosan nanoparticles. J. Hazard. Mater. 185(1), 430-441.
- Chittal, V., Gracias, M., Anu, A., Saha, P., Bhaskara Rao, K.V., 2019. Biodecolorization and biodegradation of Azo dye reactive orange-16 by marine *Nocardiopsis* sp. Iran. J. Biotechnol. 17(3), 18-26. <https://doi.org/10.29252/ijb.1551>.
- Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T., Ueda, K., 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. J. Biochem. 133(5), 671-677.
- Guo, G., Li, X., Tian, F., Liu, T., Yang, F., Ding, K., Liu, C., Chen, J., Wang, C., 2020. Azo dye decolorization by a halotolerant consortium under microaerophilic conditions. Chemosphere 244, 125510. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125510>.
- Hsueh, C.C., Chen, B.Y., 2008. Exploring effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Pseudomonas luteola*. J. Hazard. Mater. 154 (1-3), 703-710.
- Jadhav, S.B., Surwase, S.N., Kalyani, D.C., Gurav, R.G., Jadhav, J.P., 2012. Biodecolorization of Azo dye remazol orange by *Pseudomonas aeruginosa* BCH and toxicity (oxidative stress) reduction in *Allium cepa* root cells. Appl. Biochem. Biotechnol. 168, 1319-1334.
- Kalme, S.D., Parshetti, G.K., Jadhav, S.U., Govindwar, S.P., 2007. Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue-6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. Bioresour. Technol. 98, 1405-1410. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.023>.
- Kalyani, D.C., Telke, A.A., Dhanve, R.S., Jadhav, J.P., 2009. Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. J. Hazard. Mater. 163, 735-742. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.020>.
- Khalid, A., Arshad, M., Crowley, D.E., 2008. Decolorization of azo dyes by *Shewanella* sp. under saline conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79, 1053-1059.
- Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S., Chimni, S.S., 2005. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. Dyes Pigm. 67(1), 55-61.

- Lade, H.S., Waghmode, T.R., Kadam, A.A., Govindwar, S.P., 2012. Enhanced biodegradation and detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 72, 94-107.
- Lalnunhlumi, S., Krishnaswamy, V., 2016. Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. *Braz. J. Microbiol.* 47(1), 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.013>.
- Li, K., Lou, Y., Han, L., Wang, C., 2021. Azo Dye Decolorization by Consortium HR under High Temperature and Salinity. *IOP Conf. Ser: Earth. Environ. Sci.* 791(1), 012090.
- Lin-Na, D., Sheng, W., Gang, L., Bing, W., Xiao-Ming, J., Yu-Hua, Z., Yun-Long, C., 2011. Biodegradation of malachite green by *Pseudomonas sp.* strain DY1 under aerobic condition: characteristics, degradation products, enzyme analysis and phytotoxicity. *Ecotoxicol.* 20, 438-446.
- Mane, U., Gurav, P., Deshmukh, A., Govindwar, S., 2008. Degradation of textile dye reactive navy-blue Rx (Reactive blue-59) by an isolated Actinomycete *Streptomyces krainskii* SUK-5. *Malaysian J. Microbiol.* 4(2), 1-5. <https://doi.org/10.21161/mjm.10408>.
- Ogugbue, C.J., Sawidis, T., 2011. Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triarylmethane dyes by *Aeromonas hydrophila* isolated from industrial effluent. *Biotechnol. Res. Int.* 2011.
- Pillai, H.P.J.S., 2017. Optimization of process conditions for effective degradation of azo blue dye by *Streptomyces* DJP15. *J. Pure Appl. Microbiol.* 11(4), 9.
- Rahman, S.M., Saha, A.K., Ruhi, R.A., Haque, M.F., Mohanta, M.K., 2019. Decolorizations of textile azo dye direct Red 81 by bacteria from textile industry effluent. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 8, 1742-1754. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.804.203>.
- Rajendran, R., Kiruthika, S., Saranya, P., Arunkumar, M., Vaishali, C.V., 2021. Biodecolorization of Azo Dye Mixture (Remazol Brilliant Violet 5r and Reactive Red 120) by Indigenous Bacterial Consortium Obtained from Dye Contaminated Soil. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-322758/v1>.
- Reda, F.M., El-Mekkawy, R.M., Hassan, N.S., 2019. Detoxification and bioremediation of sulfa drugs and synthetic dyes by *Streptomyces mutabilis* A17 laccase produced in solid state fermentation. *J. Pure Appl. Microbiol.* 13(1), 85-96. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.1.09>. Article 5481.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Kalyani, D.C., Chang, J.S., Govindwar, S.P., 2009. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. *Bioresour. Technol.* 100 (9), 2493-2500.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., Govindwar, S.P., 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 42(1), 138-157.
- Siddeeg, S.M., Tahooun, M.A., Mnif, W., Ben Rebah, F., 2020. Iron oxide/chitosan magnetic

- nanocomposite immobilized manganese peroxidase for decolorization of textile wastewater. *Process.* 8(1), 5. <https://doi.org/10.3390/pr8010005>.
- Solís, M., Solís, A., Pérez, H.I., Manjarrez, N., Flores, M., 2012. Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process. Biochem.* 47(12), 1723-1748.
- Sugumar, S., Thangam, E.B., 2012. Biodegradation and decolorization of Reactive orange 16 by *Nocardiosis alba* soil isolate. *J. Bioremediat. Biodegrad.* 3(6).
- Varjani, S.J., Upasani, V.N., 2017. Critical review on biosurfactant 788 analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model 789 biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 232, 389-397.
- Yang, X.Q., Zhao, X.X., Liu, C.Y., Zheng, Y., Qian, S.J., 2009. Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. *Process. Biochem.* 44, 1185-1189.
- Zhuang, M., Sanganyado, E., Zhang, X., Xu, L., Zhu, J., Liu, W., Song, H., 2020. Azo dye degrading bacteria tolerant to extreme conditions inhabit nearshore ecosystems: optimization and degradation pathways. *J. Environ. Manag.* 261, 110222. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110222>.

Chapitre V

Dégradation des colorants azoïques

Par Streptomyces

V.1. Introduction

Ce chapitre est divisé en deux volets distincts mais complémentaires. Tout d'abord, il se consacre à l'étude de la biodégradation du Bleu d'Evans à l'aide de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette méthode analytique permettra de quantifier avec précision la dégradation du colorant et de fournir des résultats exploitables. Les données ainsi obtenues serviront de base pour élaborer une voie potentielle de dégradation du Bleu d'Evans, offrant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à ce processus.

Dans un second volet, l'accent sera mis sur l'exploration du spectre de dégradation de divers colorants azoïques par les *Streptomyces* isolées. Cette étude permettra de déterminer comment ces micro-organismes interagissent avec différents colorants azoïques et comment ces interactions se traduisent en termes de dégradation. En examinant la dégradation de plusieurs colorants azoïques, nous pourrions dégager des tendances et des similitudes, ce qui contribuera à une compréhension plus globale des capacités de dégradation de ces micro-organismes.

Ce chapitre présente ainsi une approche complète pour étudier la biodégradation des colorants azoïques, en allant de l'analyse précise d'un colorant spécifique à une vision plus large de la capacité de dégradation des *Streptomyces* isolées vis-à-vis de plusieurs colorants azoïques.

V.2. Etude de la biodégradation du Bleu d'Evans par HPLC

La dégradation du colorant BE a été suivie par HPLC. Les résultats présentés sur la Figure 49 ont montré la capacité des souches d'actinobactéries à dégrader le Bleu d'Evans en comparant la surface du pic des échantillons après décoloration avec celle de l'échantillon témoin (colorant pur). Le profil d'élution du BE par HPLC sans aucun inoculum bactérien (échantillon témoin) a montré la présence d'un pic important au temps de rétention de 3,83 min et un pic mineur au temps de rétention de 4,38 min. Cependant, les profils d'élution par HPLC du BE traité avec les souches A011, A013 et S1T049 ont montré une disparition totale des pics par rapport au chromatogramme de contrôle. Dans le traitement par la souche B061, des pics mineurs sont apparus à 240 nm avec des temps de rétention, respectivement, de 3,05 et 4,42 min. La disparition du pic majeur du colorant pur après décoloration indique une transformation complète du colorant en d'autres produits plus simples et confirme la dégradation du colorant BE par les souches actinobactériennes testées : *Streptomyces* sp. B061, A011, A013 et S1T049. Selon la littérature, plusieurs chercheurs ont utilisé l'analyse HPLC pour identifier la dégradation du colorant par les micro-organismes (**Kalyani et al., 2009 ; Chittal et al., 2019 ; Thanavel et al., 2020**). Les *Streptomyces* ont des systèmes

enzymatiques efficaces capables de compléter la dégradation des colorants azoïques dans une large gamme de conditions optimales, mais peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes réactionnels impliqués dans la dégradation et sur l'identification des principaux intermédiaires transitoires par *Streptomyces*. Nous avons proposé que les peroxydases extracellulaires convertissent le colorant azoïque en produits moins toxiques par des clivages alternatifs asymétriques et symétriques du colorant azoïque sulfoné **(Preethi et Pathy, 2020)**.

La première étape de la biodégradation du Bleu d'Evans comprend le clivage asymétrique de la liaison azoïque conduisant à la formation du *p*-dihydroxybiphényle et de la diazine, intermédiaire réactionnel. L'intermédiaire diazine était vraisemblablement instable en présence d'oxygène moléculaire. De plus, il perd de l'azote moléculaire pour produire un radical sulfonaphtalène, qui a été piégé par le nucléophile -OH pour donner l'intermédiaire acide 4-amino-5,6-dihydroxy-1,3-naphtalène disulfonique **(Chivukula et Renganathan, 1995)**. Le 5,7-dihydroperoxyde-8-nitrosonaphtalène-2-diol a été formé par oxydation des amines, suivie d'une activité de désulfonation de la laccase comme indiqué précédemment **(Amitaia et al., 1998)**, confirmant que le Bleu d'Evans était clivé en métabolites hydroxyle et hydroperoxyde non toxiques plutôt qu'en amines aromatiques toxiques (Figure 50).

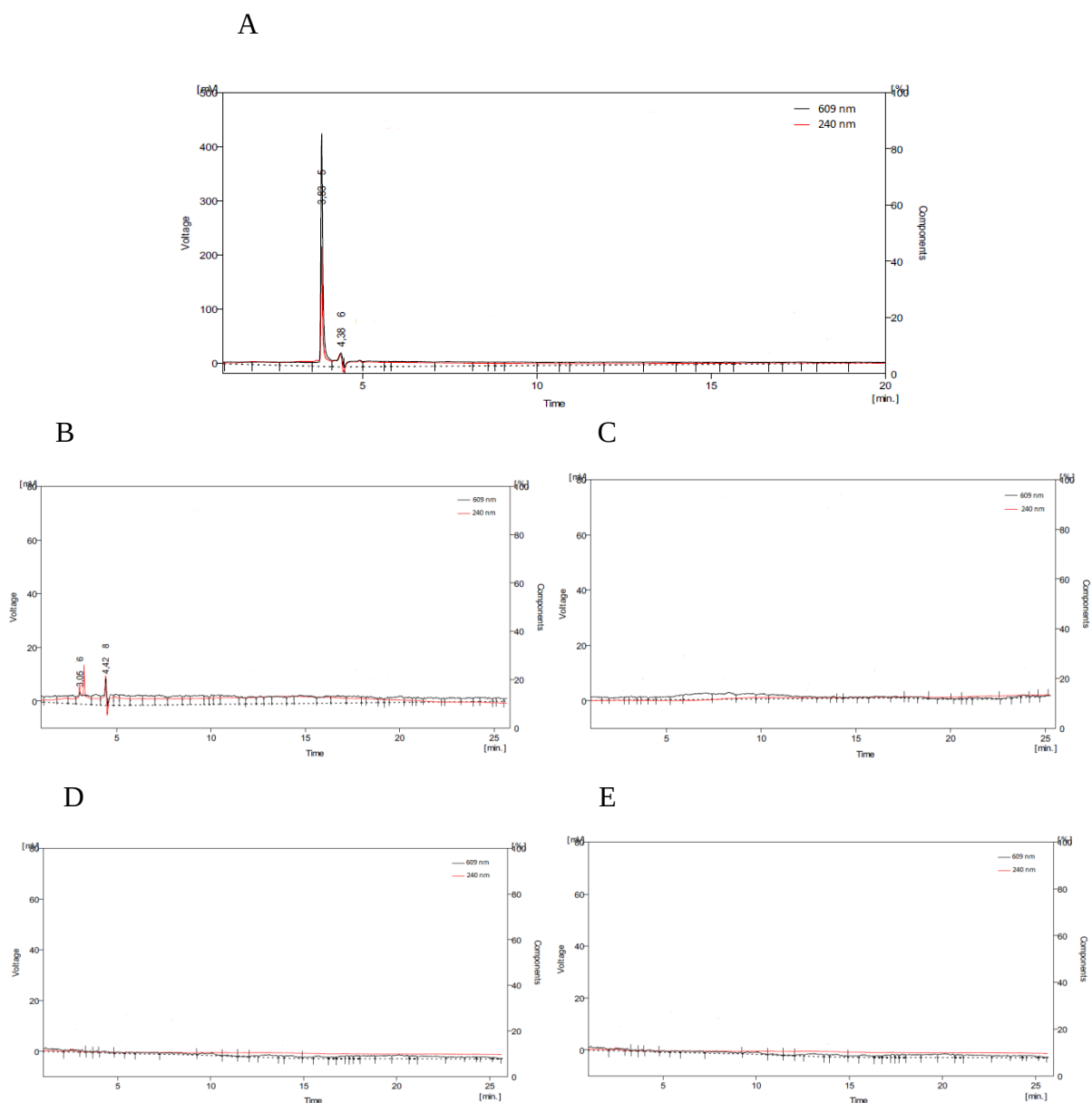


Figure 49 : Chromatogrammes HPLC. (A) Colorant BE pur (échantillon témoin) ; (B) Colorant traité avec *Streptomyces mutabilis* B061 ; (C) Colorant traité avec *Streptomyces maritimus* A011 ; (D) Colorant traité avec *Streptomyces* sp.A013 ; (E) Colorant traité avec *Streptomyces ardesiacus* S1T049

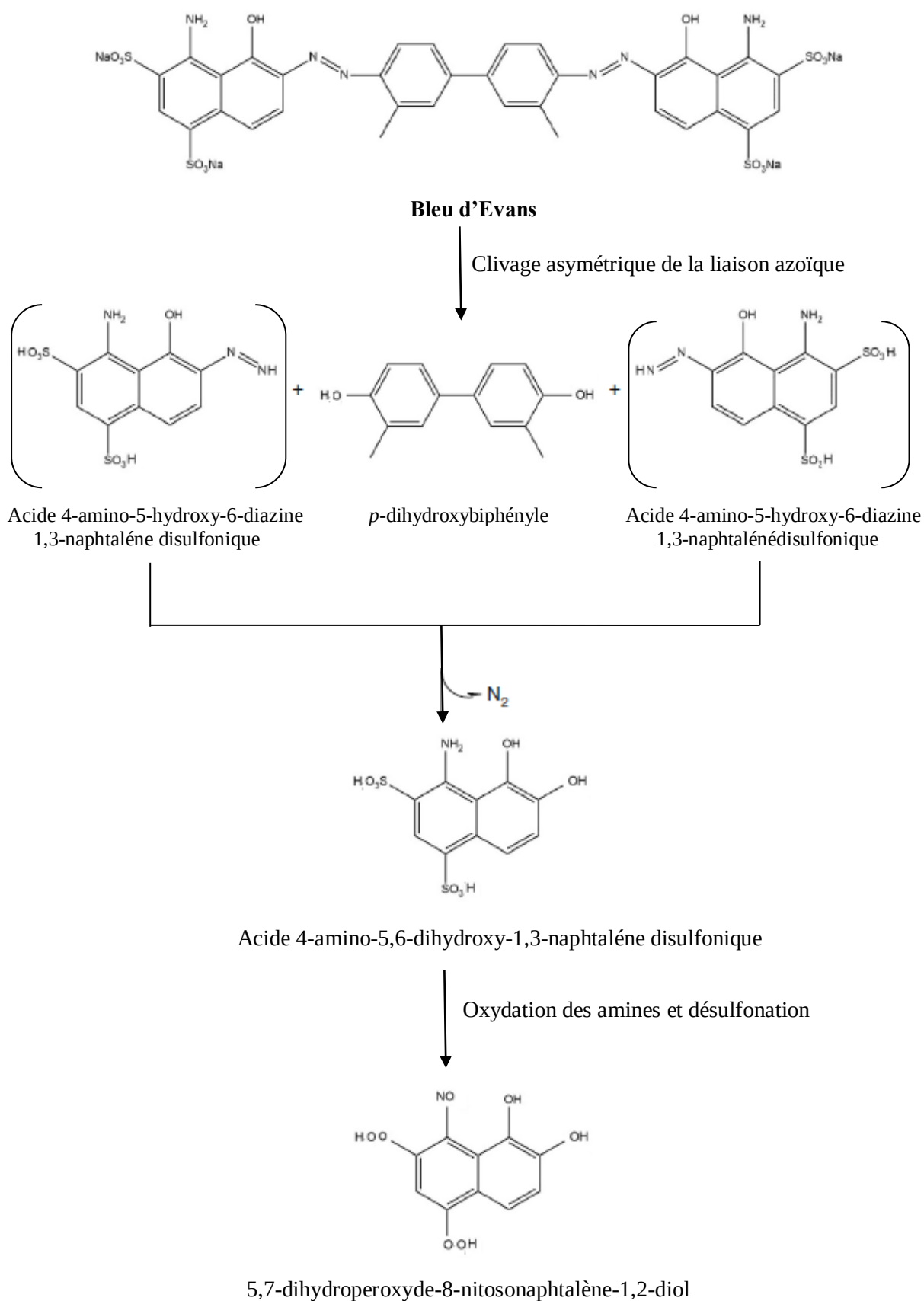


Figure 50 : Voie proposée pour la biodégradation du Bleu d'Evans. Les composés entre crochets sont les intermédiaires postulés

V.3. Utilisation des *Streptomyces* pour la dégradation des différents colorants azoïques

Pour tester l'activité des *Streptomyces* identifiées sur d'autres colorants azoïques, six colorants ont été choisis : Noir amido 10B, Noir de chlorazol E, Rouge Congo, Rouge de méthyle, Nigrosine et le Sudan II. Ces colorants sont utilisés séparément à la même concentration du Bleu d'Evans (50 mg/L).

Après 7 jours d'incubation à 30 °C, pH = 7 et 140 tr/min, les espèces de *Streptomyces* ont montré un potentiel variable de dégradation de différents colorants azoïques. Comme le montre la Figure 51, les souches A011, A013, B061 et S1T049 étaient capables de décolorer divers colorants azoïques tels que le Noir amido 10B, Noir de chlorazol E, Rouge Congo, Rouge méthyle et Nigrosine.

Les résultats de décoloration les plus élevés étaient supérieurs à 85 %, observés pour le Noir de chlorazol E et le Nigrosine, alors qu'il y avait une faible décoloration du Rouge de méthyle. Cependant, aucune décoloration significative n'a été observée pour le colorant Sudan II. Pour le Noir amido 10B, nous avons noté des pourcentages de 76,4, 72,02, 67,33 et 70,18 % pour les souches A011, A013, B061 et S1T049, respectivement. Aussi, pour le Rouge Congo nous avons relevé des taux de décoloration de 69, 61,2, 55,33 et 62,15 % pour les souches A011, A013, B061 et S1T049, respectivement.

Les résultats révélés par la présente enquête indiquent que les souches identifiées pourraient décolorer les colorants structurellement complexes contenant deux ou trois liaisons azoïques ($-N=N-$) avec des groupes sulfo- et des groupes polyaromatiques, tandis que des colorants structurellement plus simples tels que le Sudan II et le rouge de méthyle (avec une liaison azoïque et sans substituants sulfonates) étaient difficiles à décolorer. **Khalid et Mahmood (2015)** ont, également, mentionné que les espèces de *Streptomyces* étaient capables de décolorer le Rouge Congo avec deux liaisons azoïques et des groupes polyaromatiques et sulfo-, tandis que l'Orange II (avec une seule liaison azoïque et un seul groupe sulfo-) n'était pas décomposé. Il a été rapporté que les colorants azoïques avec un groupe fortement attracteur d'électrons comme substituant (par exemple, un groupe sulfo-) étaient plus facilement biodécolorés. De plus, la position (par exemple, ortho, méta, para) du substituant à la liaison azoïque pourrait, également, affecter l'efficacité de la décoloration. Par conséquent, la position et la nature des substituants sur la molécule de colorant influencent la décoloration (**Hsueh et Chen, 2008**).

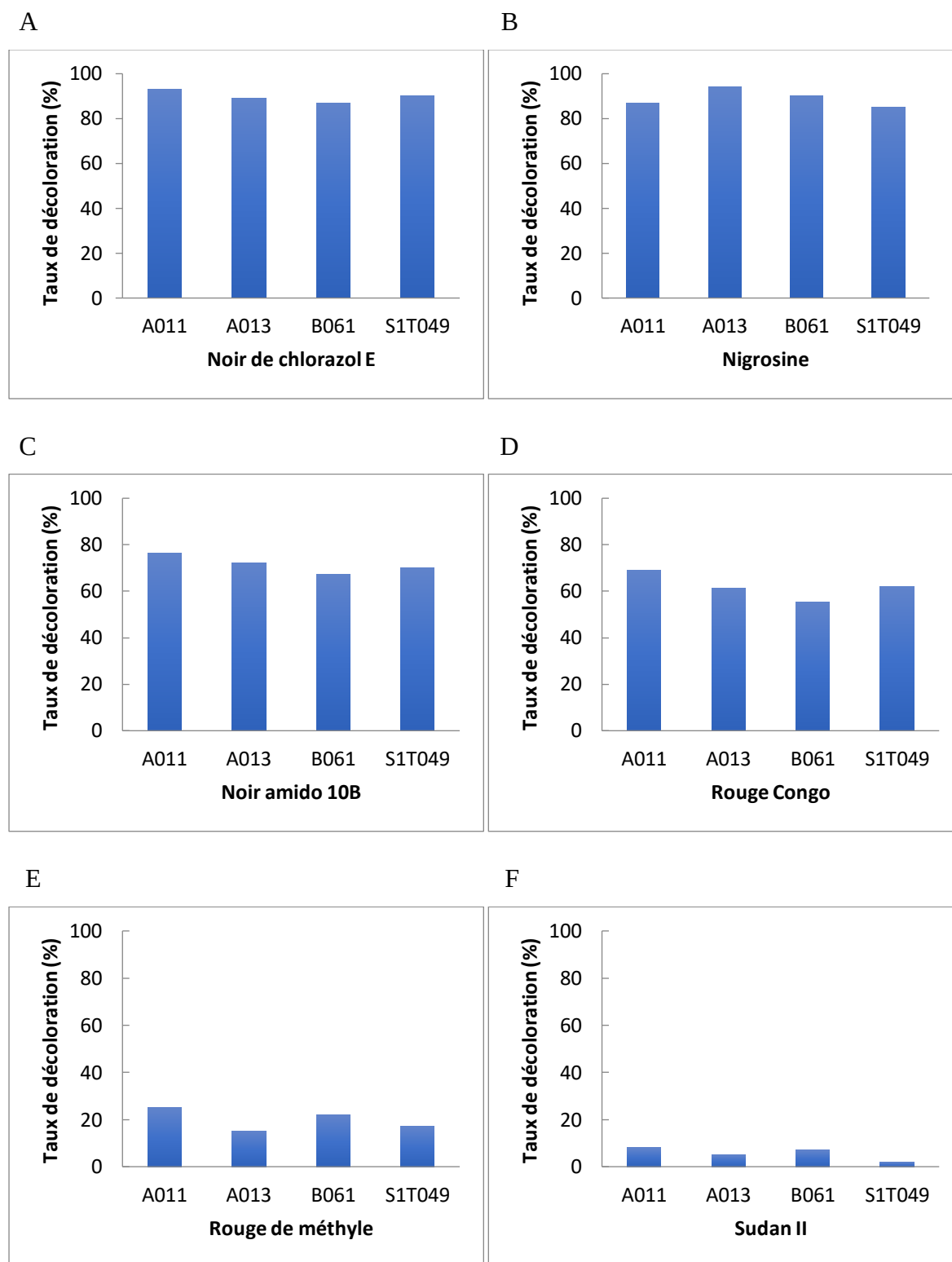


Figure 51 : Evolution du rendement de la décoloration. (A) Noir de chlorazol E ; (B) Nigrosine ; (C) Noir amido 10B ; (D) Rouge Congo ; (E) Rouge de méthyle ; (F) Sudan II en fonction du temps, et en présence de *Streptomyces maritimus* A011, *Streptomyces* sp.A013, *Streptomyces mutabilis* B061, *Streptomyces ardesiacus* S1T049

V.4. Conclusion

En somme, l'utilisation de la HPLC pour étudier la dégradation du Bleu d'Evans par les *Streptomyces* permet de suivre de manière précise et détaillée le processus de dégradation, d'obtenir des informations sur les produits de dégradation, et de proposer des mécanismes de dégradation potentiels, ce qui est essentiel pour la compréhension des processus de biodégradation des colorants azoïques par ces micro-organismes.

L'étude du spectre de dégradation de divers colorants azoïques (Noir amido 10B, Noir de chlorazol E, Rouge Congo, Rouge de méthyle, Nigrosine et le Sudan II) par les *Streptomyces* isolées permet de comprendre comment ces micro-organismes interagissent avec une gamme de colorants azoïques différents. Chaque colorant peut avoir une structure chimique unique, ce qui peut influencer sa biodégradation.

L'analyse du spectre de dégradation permettra également de comparer la capacité des *Streptomyces* isolées à dégrader différents colorants azoïques. Les résultats obtenus aideront à déterminer quelles souches de *Streptomyces* sont les plus efficaces dans la dégradation de ces colorants et comment la structure chimique des colorants influence ce processus. Ces informations peuvent être précieuses pour le traitement des eaux usées contenant des colorants azoïques, où la biodégradation peut être une stratégie environnementalement favorable pour éliminer ces composés toxiques.

Références

- Amitaia, G., Adania, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D., Hear, Y., 1998. Oxidative biodegradation of phosphoro-thiolates by fungal laccase. *FEBS Lett.* 438(3), 195-200. doi:10.1016/S0014-5793(98)01300-3.
- Chittal, V., Gracias, M., Anu, A., Saha, P., Bhaskara Rao, K.V., 2019. Biodecolorization and biodegradation of Azo dye reactive orange-16 by marine *Nocardiopsis sp.* *Iran. J. Biotechnol.* 17(3), 18–26.
- Chivukula, M., Renganathan, V., 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase From *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(12), 4374-4377.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39(4), 783-791.
- Hsueh, C.C., Chen, B.Y., 2008. Exploring effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Pseudomonas luteola*. *J. Hazard. Mater.* 154(1-3), 703-710.
- Kalyani, D.C., Telke, A.A., Dhanve, R.S., Jadhav, J.P., 2009. Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas sp.* SUK1. *J. Hazard. Mater.* 163(2-3), 735-742.
- Khalid, A., Mahmood, S., 2015. The biodegradation of azo dyes by actinobacteria. In: Singh, S. (Ed.), *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters*. *Environ. Sci. Eng. Springer, Cham.* pp, 297-314.
- Preethi, S., Pathy, R., 2020. Exploring prospective forested wetland—actinomycetes for biodeterioration of genotoxic textile azo dyes. *Indian J. Exp. Biol.* 58(5), 344-354.
- Thanavel, M., Bankole, P.O., Selvam, R., Govindwar, S.P., Sadasivam, S.K., 2020. Synergistic effect of biological and advanced oxidation process treatment in the biodegradation of Remazol yellow RR dye. *Sci. Rep.* 10(1), 20234.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans cette étude, nous avons exploré le potentiel des actinobactéries, en particulier des *Streptomyces* isolées de différentes régions d'Algérie, comme une solution prometteuse pour le traitement des eaux usées contenant une variété de colorants synthétiques. Notre principal objectif était de déterminer la capacité de ces micro-organismes à dégrader le colorant Bleu d'Evans (BE) dans des conditions d'agitation spécifiques.

De plus, nous avons étudié l'impact de divers paramètres physicochimiques, notamment la vitesse d'agitation, la température, le pH, la concentration du colorant, la concentration en sel, la source du carbone et la présence d'ions métalliques, sur l'efficacité de dégradation du Bleu d'Evans. Ces facteurs ont été révélés comme ayant une influence significative sur le processus de dégradation, ce qui souligne l'importance de contrôler ces paramètres pour optimiser le traitement des eaux usées contenant des colorants.

Nos recherches ont clairement démontré que les souches de *Streptomyces* que nous avons identifiées possédaient une capacité de dégradation du Bleu d'Evans dépassant les 97 %. Ces performances ont été réalisées dans des conditions optimales comprenant une concentration initiale de colorant de 50 mg/L, une température maintenue à 30 °C, un pH équilibré à 7, une agitation à 140 tr/min, un temps d'incubation de 7 jours, et une salinité n'excédant pas 1 mol/L. Ces résultats suggèrent fortement le potentiel de ces souches dans le traitement des eaux usées, non seulement pour le Bleu d'Evans, mais également pour d'autres colorants azoïques tels que le Noir de chlorazol E, la Nigrosine, le Noir amido 10B, le Rouge Congo et le Rouge de méthyle.

Une caractéristique essentielle des *Streptomyces* est leur distribution ubiquitaire dans divers écosystèmes, ainsi que leur capacité à s'adapter à une large gamme de conditions environnementales. Ils ont évolué avec des mécanismes d'adaptation variés, ce qui leur confère une meilleure survie dans des environnements changeants. De plus, ces actinobactéries possèdent des systèmes enzymatiques hautement efficaces qui sont capables de dégrader complètement les colorants textiles dans des conditions optimales diverses.

Dans le contexte industriel, les souches microbiennes que nous avons identifiées, notamment *Streptomyces maritimus* A011, *Streptomyces* sp.A013, *Streptomyces mutabilis* B061 et *Streptomyces ardesiacus* S1T049, présentent un potentiel extrêmement prometteur pour être exploitées dans le traitement des effluents industriels issus de l'industrie textile, particulièrement contaminés par des colorants azoïques. Cela ouvre des perspectives

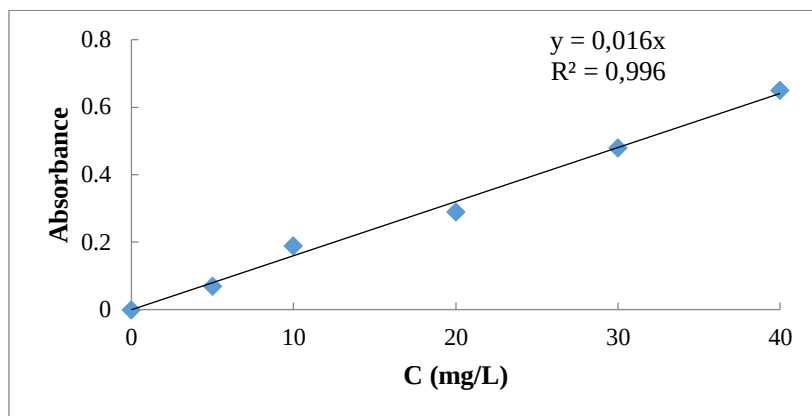
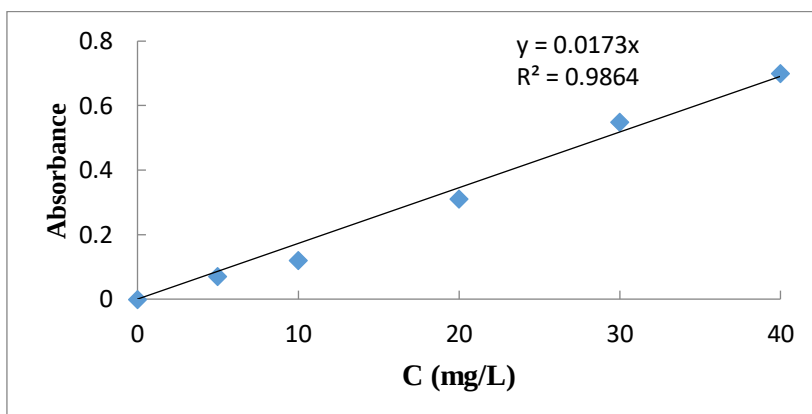
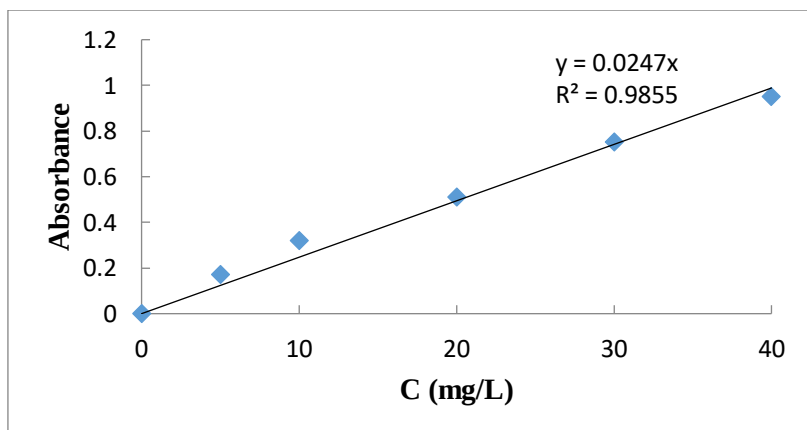
passionnantes pour la mise en œuvre de ces micro-organismes dans le domaine de la gestion des déchets industriels et de la réduction de la pollution environnementale.

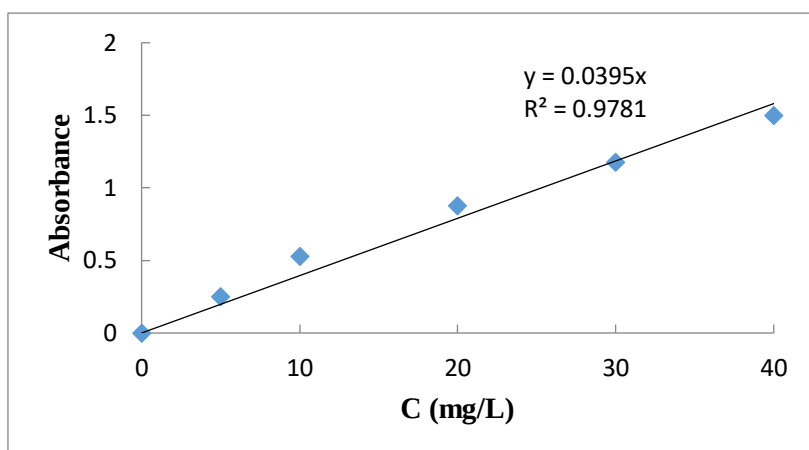
Il convient de souligner l'importance de mener des recherches supplémentaires pour caractériser plus en profondeur les produits de dégradation générés par ces souches de *Streptomyces*. Cette étape de recherche plus approfondie sera essentielle pour acquérir une compréhension plus complète du processus de dégradation des colorants textiles par ces micro-organismes. Elle permettra également d'optimiser en permanence ces souches microbiennes en vue de leur application pratique dans le traitement des effluents industriels, favorisant ainsi une gestion plus efficace des déchets et une réduction substantielle de l'impact environnemental de l'industrie textile.

Annexe

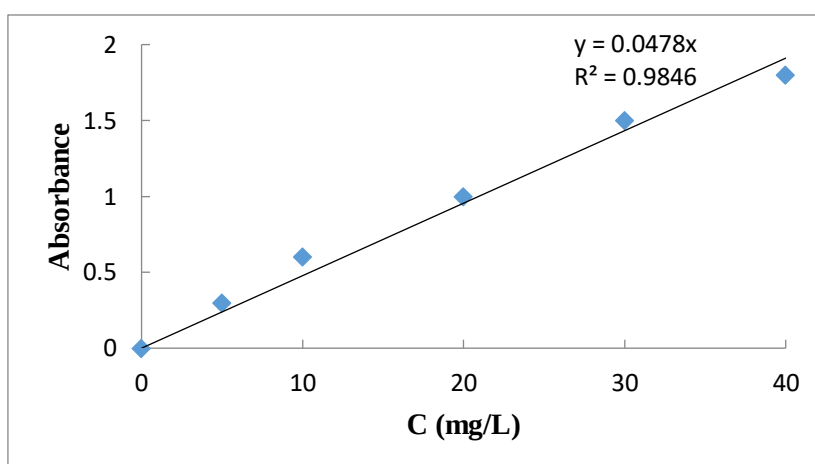
ANNEXE

1. Les courbes d'étalonnage des colorants azoïques

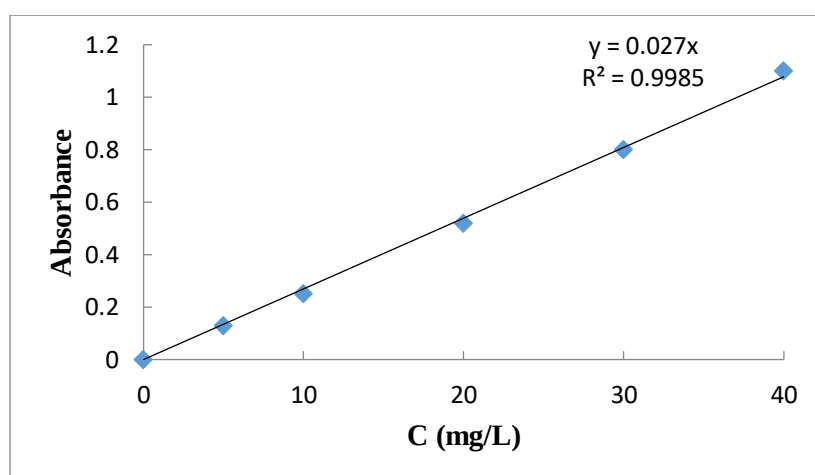
Courbe d'étalonnage du Bleu d'Evans ($\lambda_{\max} = 609 \text{ nm}$)Courbe d'étalonnage du Noir de chlorazol ($\lambda_{\max} = 578 \text{ nm}$)Courbe d'étalonnage du Nigrosine ($\lambda_{\max} = 576 \text{ nm}$)



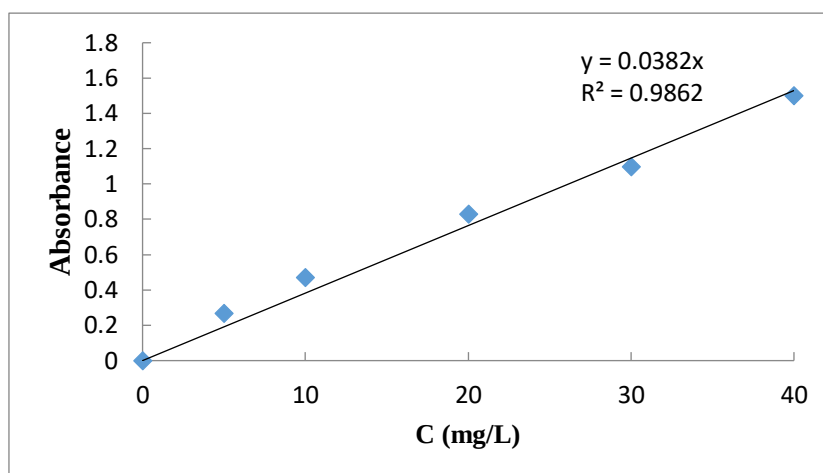
Courbe d'étalonnage du Noir amido 10B ($\lambda_{\max} = 622 \text{ nm}$)



Courbe d'étalonnage du Rouge Congo ($\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$)



Courbe d'étalonnage du Rouge de méthyle ($\lambda_{\max} = 410 \text{ nm}$)



Courbe d'étalonnage du Sudan II ($\lambda_{\text{max}} = 508 \text{ nm}$)

2. Composition des milieux de culture

* Milieu minimum

Pour 1 litre d'eau distillée :

15 g Agar
 0,05 g Bleu d'Evans

Base minérale :

0,08 g K_2HPO_4
 0,02 g KH_2PO_4
 0,005 g $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 0,001 g FeSO_4

Stériliser le milieu par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes

* Milieu TSA

Pour 1 litre d'eau distillée :

3,4 TSB
 12 g Agar

Stériliser le milieu par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes

*** Milieu TSB**

15 g	Tryptone
5 g	Peptone papainique de Soja
5 g	Chlorure de sodium
15 g	Agar

Abstract

Discharges of the dyeing process have become a main source of pollution for water resources, due to their xenobiotic and toxic properties to both wildlife and humans. To remedy this problem, we have opted for a biological treatment approach aimed at eliminating unwanted dyes and their toxicity.

In a first step, we successfully isolated four distinct strains of *Streptomyces*, from different types of soil which present a significant potential to degrade Evans Blue azo dye. These strains were identified as belonging to *Streptomyces maritimus*, *Streptomyces mutabilis*, and *Streptomyces ardesiacus*.

Secondly, we carried out a series of experiments aimed at studying the parameters which influence the degradation of the Evans Blue dye. These parameters included incubation time, temperature, pH, carbon source, dye concentration, salt concentration and the presence of certain metal ions.

Finally, we examined the biodegradation of Evans Blue by HPLC, and also, we studied the capacity of the identified *Streptomyces* to degrade other azo dyes such as Amido black 10B, Chlorazol black E, Congo Red, Red of methyl, Nigrosine and Sudan II.

Key Words : Xenobiotic, Toxicity, *Streptomyces*, Azo dyes, Biodegradation.

ملخص

أصبحت المخلفات الناتجة عن عملية الصباغة مصدرًا أساسيًا لتلوث الموارد المائية، وذلك بسبب خصائصها الملوثة والسامة لكل من الحياة البرية والبشرية. لحل هذه المشكلة، اخترنا استخدام العلاج البيولوجي الذي يهدف إلى القضاء على الأصباغ غير المرغوب فيها والسموم المصاحبة لها.

في خطوة أولى، نجحنا في عزل أربع سلالات متميزة من الستربتومييسيس، من أنواع مختلفة من التربة، والتي لها قدرة كبيرة لتحليل صبغة إيفانز الزرقاء. وقد تم التعرف على هذه السلالات على أنها تنتمي إلى :

Streptomyces maritimus, *Streptomyces mutabilis* و *Streptomyces ardesiacus*

ثانيًا، أجرينا سلسلة من التجارب تهدف إلى دراسة العوامل التي تؤثر على تحليل صبغة إيفانز الزرقاء. وشملت هذه العوامل مدة الحضانة، درجة الحرارة، درجة الحموضة، مصدر الكربون، تركيز الصبغة، تركيز الملح ووجود شوارد معدنية معينة.

أخيرًا أجرينا تحليلًا أكثر تعمقًا للتحلل الحيوي لصبغة إيفانز الزرقاء باستخدام تحليل كروماتوجرافي عالي الأداء. في الوقت نفسه، قمنا بتقييم قدرة السلالات التي حددناها على تحليل أصباغ الأزو الأخرى بما في ذلك :

Amido black 10B ،Chlorazol black E ،Congo Red ،Methyl Red ،Nigrosine و Sudan II.

كلمات البحث : تلوث، السموم، الستربتومييسيس، أصباغ الأزو، التحلل البيولوجي.