

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université SAAD DAHLAB-BLIDA 1**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département : Biologie et Physiologie Cellulaire**  
**Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé**

**Mémoire**

***Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie***

**Option : Microbiologie**

***THEME***

**Etude de la Biodégradation des colorants synthétiques : Isolement des  
microorganismes et influence des conditions de culture**

**Présenté par :**

***Benbekhti Houria***

***Benmeddah Zineb***

**Devant le Jury:**

<b><i>Mr Guedioura A.M</i></b>	<b><i>MCB</i></b>	<b><i>U.S.D. Blida1</i></b>	<b><i>Président.</i></b>
<b><i>Mme Bokreta S</i></b>	<b><i>MAA</i></b>	<b><i>U.S.D. Blida1</i></b>	<b><i>Examinatrice.</i></b>
<b><i>Mme Mesbaiah F.Z</i></b>	<b><i>MRB</i></b>	<b><i>CNRDPA</i></b>	<b><i>Promotrice.</i></b>
<b><i>Mme Hemaidi F</i></b>	<b><i>Pr</i></b>	<b><i>U.S.D. Blida1</i></b>	<b><i>Co-Promotrice.</i></b>

***04 Juillet 2018***

# *Remerciements*

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

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

*Nous tenons d'abord à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance à Mme Mesbaïah, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour sa qualité humaine, sa disponibilité, ces conseils et sa patience, nous les en Remercies vivement.*

*Nous aimerions exprimer notre gratitude et nos remerciements à Mme Hemaïdi, pour sa gentillesse, sa direction, Ainsi que pour nous avoir guidées et conseillées afin de mener à bien ce travail.*

*Nous sommes également reconnaissantes aux membres de Jury qui ont bien voulu examiner et discuter notre travail :*

*Nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers M<sup>m</sup> Bokreta S. qui a eu la gentillesse de lire et d'examiner ce travail.*

*Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait Mr Guedioura A.M en étant président du jury.*

*Nos remerciements sont adressés également à toute l'équipe de laboratoire de Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et d'Aquaculture « CNRDPA » - Bouismail - Tipaza.*

*Nos sincères remerciements vont également à Mr Tefahi Dj. pour leur aide et leurs conseils à fin de réaliser ce travail.*

*N'oublions pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.*

*Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# *Dédicaces*

*Je dédie*

*ce modeste travail*

*A la mémoire de mon père, que l'absence n'exclue pas  
sa présence en moi, que dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

*A ma très chère maman : affable, honorable, aimable.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour éternel  
et ma considération pour son sacrifice, son multiple soutiens  
et pour son affection quotidienne, Que dieu la garde pour moi.*

*A mon cher frère Brahim pour*

*ces conseils, son soutien moral et*

*pour tout ses efforts.*

*A mes très chères sœurs pour toute l'affection qu'elles m'ont  
données et pour leurs précieux encouragements.*

*A mes chers petits neveux et nièces : Amine, Yasser,*

*Sabah, Rouaida, Douaa et Farah.*

*A toute ma famille.*

*A toutes mes chères amies avec  
lesquelles je partage des souvenirs  
inoubliables.*

*Houria ...*



# *Dédicaces*

*Je dédie*

*Cet humble travail*

*A mes chers parents "Benmeddah Mohammed" et "Aïssani Cheréfa"  
pour leur soutien, leur protection, leurs sacrifices,  
et leur sollicitude tout au long de mes études.*

*A mon fiancé "Akili Fouad" qui était toujours à mes côtés  
et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager.*

*A mes chères sœurs "Asma et Samia".*

*A toute ma famille.*

*A toutes mes chères amies sans exception.*

*Et a ceux qui ont  
contribué à l'achèvement de ce  
travail.*

*Zineb ...*



## Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	
I.1 Pollution des milieux aquatiques .....	3
I.2 Classification selon le type de pollution .....	3
I.3 Classification selon l'origine de la pollution .....	3
I.4 Pollution par les colorants .....	4
I.5 Colorants synthétiques .....	5
I.6 Classification des colorants .....	5
I.7 Colorants azoïques .....	7
I.8 Toxicité des colorants .....	8
I.9 Traitement des rejets colorés .....	9
I.9.1 Méthodes chimiques .....	9
I.9.2 Méthodes physiques .....	9
I.9.3 Méthodes biologiques .....	10
I.10 Biodégradation des colorants .....	10
I.10.1 Biodégradation par les champignons .....	11
I.10.2 Biodégradation par les levures .....	11
I.10.3 Biodégradation par les algues .....	12
I.10.4 Biodégradation par les Actinomycètes : .....	12
I.10.5 Biodégradation par les bactéries .....	12
Chapitre II: Matériel et méthodes.....	
II.1 Lieu d'étude .....	21
II.2 Matériels .....	21
II.2.1 Produits utilisés .....	21
II.2.2 Matériels utilisés .....	21
II.3 Méthodologie expérimentale .....	21
II.3.1 Isolement des souches .....	21
II.3.2 Sélection de la souche performante .....	22
II.3.3 Identification de la souche performante .....	22
II.3.4 Choix de milieu de dégradation.....	26
II.3.5 Effet de la concentration initiale du colorant .....	26

II.3.6 Effet de la salinité du milieu .....	26
II.3.7 Effet du pH du milieu.....	26
II.3.8 Effet de la température .....	27
II.3.9 Effet de l'agitation.....	27
II.3.10 Effet de la biodégradation du MO par le surnageant de la culture.....	27
II.3.11 Suivi de la dégradation .....	27
II.3.12 Etude de l'efficacité de la biodégradation des colorants synthétique par la souche E4O.....	27
Chapitre III: Résultat et discussion.....	
III.1 Isolement des souches.....	28
III.2 Sélection de la souche performante .....	29
III.3 Identification de la souche performante.....	29
III.4 Effet de la composition de milieu.....	32
III.5 Effet de la concentration initiale .....	33
III.6 Effet de la salinité du milieu .....	34
III.7 Effet du pH du milieu .....	35
III.8 Effet de la température .....	36
III.9 Effet de l'agitation .....	37
Conclusion.....	41
Références bibliographiques.....	
Annexes.....	

## Liste des tableaux

- **Tableau I** : Classification chimique des colorants.....6
- **Tableau II** : Classification tinctoriale des colorant.....7
- **Tableau III** : Propriétés physico-chimiques du Méthyle orange.....21
- **Tableau IV**: Aspect macroscopique des colonies isolées sur milieu GN.....28
- **Tableau V** : Résultats de la galerie Api 20E de la souche E4O .....32
- **Tableau VI**: Effet de différents milieux de cultures sur la dégradation de MO après 2 jours d'incubation.....33
- **Tableau VII**: Pourcentage de dégradation de différents colorants par *A. hydrophila* E4O.....39

## Liste des figures

- **Figure 1** : Réduction du rouge réactif 22 par *Pseudomonas luteola*.....13
- **Figure 2** : Minéralisation du colorant azoïque jaune mordant 3 (MY3) à l'aide d'un système de réacteur séquentiel anaérobie/aérobie. ....15
- **Figure 3**: Mécanisme de dégradation de l'acide orange 20 par *Pseudomonas* K24.....16
- **Figure 4**: Biotopie d'isolement.....21
- **Figure 5** : Résultat de coloration de Gram de la souche E4O .....29
- **Figure 6**: Résultat du test de catalase.....30
- **Figure 7** : Oxydase positif de la souche E4O. ....30
- **Figure 8** : Résultat de la recherche de type respiratoire d'E4O dans le milieu VF.....30
- **Figure 9**: Résultat de la recherche de fermentation des de sucre dans le milieu TSI.....31
- **Figure 10** : Effet de la concentration initial sur la dégradation de MO après 7 jours d'incubation.....34
- **Figure 11** : Effet de la salinité sur la dégradation de MO après 7 jours d'incubation.....35
- **Figure 12** : Effet de pH de milieu sur la dégradation de MO après 7 jours d'incubation.....36
- **Figure 13** : Effet de la température sur la dégradation de MO après 7 jours d'incubation.....37



## Liste des Abréviations

- ❖ **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ❖ **Af** : Absorbance finale
- ❖ **Ai** : Absorbance initiale
- ❖ **ARNr** : Acide Ribonucléique
- ❖ **C** : Concentration du Méthyle orange.
- ❖ **GN** : Gélose nutritive
- ❖ **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène
- ❖ **HCl** : Acide chlorhydrique
- ❖ **MO** : méthyle orange
- ❖ **MSM**: Mineral Salt Midium
- ❖ **NADP**: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- ❖ **NAPH**: Naphtalène
- ❖ **Sp** : Espèce non précisée
- ❖ **UV** : Ultra-violet

## Glossaire:

- ❖ **Abrasion** : Action d'user par frottement, grattement ou altération spontanée.
- ❖ **Aérobic** : Désigne des microorganismes qui se développent en présence d'oxygène.
- ❖ **Anaérobic** : Désigne les microorganismes capables de se développer dans un milieu privé d'oxygène.
- ❖ **Auxochrome** : Substituant ionisable permettant la fixation de la molécule à laquelle il est ajouté.
- ❖ **Chromophore** : Groupe chimique insaturé conduisant à une couleur caractéristique du composé, due à l'absorption de rayonnement visible.
- ❖ **Cinétique (de réaction)**: Vitesse d'un événement réactionnel. Par extension, suivi d'un processus ou d'une réaction en fonction du temps.
- ❖ **Dépollution**: Élimination ou inactivation spontanée ou intentionnelle d'un polluant par des agents physiques, chimiques ou biologiques.
- ❖ **Effluent**: Phase (généralement aqueuse ou gazeuse) contenant le(s) produit(s) à dépolluer (effluent contaminé), ou au contraire, débarrassé de ce produit (effluent dépollué).
- ❖ **Enzyme**: Protéine dotée du pouvoir de catalyser une ou plusieurs réactions sur des réactifs définis.
- ❖ **Minéralisation**: Biodégradation dans laquelle l'étape ultime est la formation de CO<sub>2</sub>. Cette notion implique généralement qu'une partie du composé a été assimilée par l'organisme concerné (et pour lequel il a constitué un "substrat").
- ❖ **Mordant** : est un produit chimique, habituellement un sel métallique ou un acide lequel est traité la fibre à teindre, de façon à faciliter la fixation du colorant, par formation d'un complexe colorant-mordant insoluble.
- ❖ **Rejet**: Terme souvent utilisé dans le sens d'émission dans le milieu naturel de produits indésirables (fumée, gaz non brûlé, résidu de fabrication, frac, eaux de refroidissement ou de lavage, etc...) par un établissement industriel, un système d'épuration urbaine ou une collectivité. Mais un rejet peut aussi être constitué par des liquides ou des gaz déjà partiellement ou totalement dépollués.

## Résumé :

Les colorants sont largement utilisés dans différents domaines. Cependant, ces colorants sont à l'origine de la pollution une fois évacués dans l'environnement. Les colorants azoïques sont toxiques et mutagènes et le traitement biologique de ces colorants semble présenter un intérêt scientifique majeur.

A ce titre, les objectifs de notre travail sont d'isoler des souches microbiennes capables de dégrader les colorants azoïques et d'optimiser les conditions de culture pour obtenir un meilleur rendement de dégradation.

L'isolement des souches a été réalisé à partir d'un effluent industriel- urbain (Bou-Ismaïl) en utilisant un milieu MSM qui ne contient que le Méthyle orange comme source de carbone et d'énergie. La biodégradation de Méthyle orange a été suivie par spectrophotométrie UV-Visible et l'influence de conditions de culture comme le pH, la salinité, la concentration du substrat et la température a été étudiée.

L'identification morphologique et biochimique a révélé que la souche la plus performante est *Aeromonas hydrophila E40*. La biodégradation est influencée par la concentration initiale de colorant ; la salinité, le pH et la température. Les résultats obtenus démontrent une bonne capacité de dégradation de Méthyle orange (50 mg/l); avec un pourcentage de dégradation qui atteint 91% à 35°C ; à un pH neutre ; et à des concentrations faibles de NaCl après 7 jours d'incubation ; et dans des conditions statiques. Les résultats obtenus ont montré que l'enzyme responsable de la dégradation est une enzyme extracellulaire.

Mots clés : Pollution; Biodégradation; Méthyle orange ; *Aeromonas hydrophila E40*.

## **Abstract:**

Dyes are widely used in different fields. However these dyes are the source of pollution once evacuated in the environment. The azo dyes are toxic and mutagenic so the biological treatment of these dyes seems to be of major scientific interest.

As such, the objectives of our work are to isolate microbial strains capable of degrading azo dyes and to optimize the culture conditions to obtain a better degradation yield.

The isolation of the strains was carried out from an industrial-urban effluent (Bou-Ismaïl) using an MSM medium with OM as a source of carbon and energy. The biodegradation of OM was followed by UV-Visible spectrophotometer and the influence of culture conditions such as pH, salinity, substrate concentration and temperature was studied.

Morphological and biochemical identification revealed that the most effective strain was *Aeromonas hydrophila E4O*. Biodegradation is influenced by culture conditions. The results obtained demonstrate a good degradation capacity of *Aeromonas hydrophila E4O* (50 mg / l of OM); with a percentage of 91% at 35 ° C; at a neutral pH; and at low concentrations of Na Cl after 7 days of incubation; and under static conditions. The results obtained showed that the enzyme responsible for degradation is an extracellular enzyme.

Keywords: Pollution; biodegradation; orange methyl; *Aeromonas hydrophila E4O*.

## المخلص:

تستخدم الألوان على نطاق واسع وفي مجالات عديدة ومختلفة، إلا أن وجود هذه الألوان في المحيط يعرضه للتلوث. خاصة الألوان الازوية و التي تعتبر سامة، مما يجعل المعالجة البيولوجية لهذه الألوان ذات أهمية علمية كبيرة. من اجل هذا، فان الهدف من دراستنا هذه هو عزل سلالات ميكروبية قادرة على تحليل الألوان الازوية وتحسين الظروف من اجل الوصول إلى نتائج معتبرة من التحلل البيولوجي .

تم عزل سلالات من المكروبات من نفايات صناعية – حضرية ( بيواسماعيل) ، ذلك باستخدام وسط معدني يحتوي على البرتقالي الميثيلي فقط كمصدر للكربون و الطاقة.

تمت دراسة و متابعة التحلل البيولوجي للبرتقالي الميثيلي عن طريق القياس الطيفي المرئي للأشعة فوق البنفسجية، كما تمت دراسة تأثير ظروف الزرع مثل درجة الحموضة؛ الملوحة؛ درجة الحرارة و تركيز المادة.

اظهر كشف الهوية المورفولوجية والكيميائية أن *Aeromonas hydrophila E40* هي أنجع سلالة.

يتأثر التحلل البيولوجي بالتركيز الأولي للمادة ؛ الملوحة؛ درجة الحموضة ودرجة الحرارة.

بينت النتائج المتحصل عليها أن التحلل البيولوجي للبرتقالي الميثيلي (50مغ \ ل ) يكون جيدا حيث يصل إلى 91 % عندما تكون درجة الحرارة 35 ° ؛ و في درجة حموضة معتدلة؛ و نسبة قليلة من الملوحة؛ و ذلك بعد 7 أيام من الاستنبات في ظروف ثابتة.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن الإنزيم المسؤول عن التحلل هو إنزيم يتم فرزه خارج الخلية.

الكلمات المفتاحية: التلوث؛ التحلل البيولوجي؛ البرتقالي الميثيلي؛ *Aeromonas hydrophila E40*.

## Introduction

L'eau est la matière première la plus importante sur notre planète, pour les êtres humains, les animaux, les plantes et les microorganismes. Pratiquement tous les phénomènes vitaux de la biosphère sont liés à la disponibilité de l'eau.

La pollution de l'eau qui affecte les rivières, les mers, les nappes phréatiques et les lacs, est le résultat du rejet des eaux usées sans traitement ou avec un niveau de traitement insuffisant : cela provoque une dégradation de l'écosystème. Le problème est encore plus grave dans le cas des effluents industriels qui présentent un caractère toxique beaucoup plus prononcé. (Oubagha, 2011)

Les colorants de synthèse sont de plus en plus utilisés dans les industries en raison de leur facilité de synthèse, de leur rapidité de production et de leur variété de couleurs si on les compare aux colorants naturels. Notons que plus de 60% de la production mondiale en colorant est utilisé par les industries textiles et plus de la moitié de cette quantité est déversée dans les eaux réceptrices plus ou moins sans traitement (Khadhraoui *et al.*, 2009).

Les colorants et adjuvants utilisés par les industries textiles peuvent constituer une menace sérieuse pour l'environnement car leur présence dans l'eau, même à des quantités très faibles, est très visible et indésirable ; par conséquent, Leur élimination incorrecte dans les eaux usées provoque des effets toxiques aigus sur la flore et la faune aquatiques, causant de graves problèmes environnementaux (Kilany, 2017).

Par conséquent, la dépollution des eaux contaminées par les colorants s'avère nécessaire aussi bien pour la protection de l'environnement que pour une éventuelle réutilisation de ces eaux non-conventionnelles et en minimisant les pertes d'eau du fait de ce recyclage. (Oubagha, 2011)

Les traitements physico-chimiques traditionnels (adsorption, coagulation/floculation, précipitation etc.) sont couramment utilisés pour la dépollution des effluents industriels; bien qu'elles soient rapides, ces méthodes s'avèrent généralement peu efficaces en regard des normes exigées sur les rejets. Elles sont très coûteuses et chargent les rejets finaux en nombreux produits chimiques. Il apparaît donc intéressant de mettre au point des traitements alternatifs, notamment par voie biologique, qui ont l'avantage d'être moins coûteux, moins polluants et plus efficaces car plus spécifiques (Moutaouakil *et al.*, 2004).

L'objectif de notre travail est d'isoler des souches microbiennes capables de dégrader les colorants azoïques et d'optimiser les conditions de culture pour obtenir un meilleur rendement de dégradation.

Ce manuscrit se compose en trois chapitres :

**Le premier chapitre** de ce mémoire est consacré à la partie bibliographique, dans laquelle sont introduites toutes les notions et les définitions sur: la pollution, les colorants, leur classification, leur toxicité. Puis il sera présenté une synthèse bibliographique sur les méthodes de traitement des eaux usées contaminées par les colorants de textile et en particulier sur les méthodes biologiques, les microorganismes interviennent dans la biodégradation et à la fin les facteurs influencent la biodégradation des colorants.

**Le deuxième chapitre** traite la partie expérimentale, décrira l'ensemble des méthodes expérimentales et les différentes techniques analytiques ainsi que le matériel utilisé dans cette étude

**Le troisième chapitre** est consacré aux résultats et discussions sur la biodégradation du méthyle orange et L'effet de différents paramètres expérimentaux sur la cinétique et l'efficacité de biodégradation.

## **I.1 Pollution des milieux aquatiques :**

Le terme de pollution désigne l'ensemble des rejets des composés toxiques que l'homme libère dans l'écosystème, mais aussi les substances qui peuvent être vraiment dangereuses pour les organismes et exercent une influence perturbatrice sur l'environnement. En d'autre terme la pollution est une modification défavorable du milieu naturel pouvant affecter l'homme directement ou a traverses des ressources agricoles, hydriques ou d'ordre biologique. Elle peut affecter aussi ou altérer le milieu physique et les possibilités récréatives dans la nature (Oubagha, 2011).

## **L.2 Classification selon le type de pollution :**

Il existe plusieurs manières de classer la pollution. Selon le type de polluant, on peut classer la pollution en trois catégories : pollution physique, pollution chimique et pollution biologique.

### **I.2.1 Pollution physique :**

On parle de ce type de pollution quand le milieu pollué est modifié dans sa structure physique par divers facteurs. Elle regroupe la pollution mécanique (effluents solides), la pollution thermique (réchauffement de l'eau par des usines) et la pollution nucléaire (retombées de radioéléments issus des explosions d'armes nucléaires, résidus des usines atomiques et accidents nucléaires) (Oubagha, 2011).

### **I.2.2 Pollution chimique :**

Elle est due au déversement des rejets industriels apportant de grandes quantités de substances chimiques dont certaines sont non dégradables.

### **I.2.3 Pollution biologique :**

Il s'agit de la pollution par les micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons, efflorescences planctoniques, etc.)(Oubagha, 2011).

## **I.3 Classification selon l'origine de la pollution :**

Selon l'origine de la pollution, on distingue quatre catégories : pollution domestique, urbaine, agricole et pollution industrielle.



### **I.3.1 Pollution domestique :**

Elle est due principalement aux rejets domestiques (eaux de lavage, huiles de vidange, matières fécales, etc.) (Oubagha, 2011).

### **I.3.2 Pollution urbaine :**

Ce sont les eaux des habitations et des commerces qui entraînent la pollution urbaine de l'eau. Les polluants urbains sont représentés par les rejets domestiques, les eaux de lavage collectif et de tous les produits des rejets industriels rejetés par les entreprises en quantités variables selon son activité (Oubagha, 2011).

### **I.3.3 Pollution agricole :**

L'agriculture, l'élevage et l'aquaculture sont responsables du rejet de nombreux polluants organiques et inorganiques dans les eaux de surface et souterraines. Ces contaminants comprennent à la fois des sédiments provenant de l'érosion des terres agricoles, des composés phosphorés ou azotés issus des déchets animaux et des engrais commerciaux. (Oubagha, 2011).

### **I.3.4 Pollution industrielle :**

Le développement accéléré des techniques industrielles modernes a engendré une pollution très importante. Les produits en cause sont les produits chimiques et les hydrocarbures (par infiltration et ruissellement). Parmi les grandes industries polluantes, l'industrie textile qui occupe une place suffisamment importante pour être prise en compte (Oubagha, 2011).

## **I.4 Pollution par les colorants :**

Le déversement des colorants dans le milieu aquatique même à de très faibles concentrations, a un grand impact. Elles modifient la transparence et l'éclairement du milieu. L'action chlorophyllienne s'en trouve ralentie, la production d'oxygène en est diminuée et il y a tendance à l'installation des conditions anaérobies et d'eutrophisation (Oubagha, 2011)

La quantité croissante de colorants en raison des activités industrielles indique un risque probable pour l'écosystème (Kilany, 2017). Par conséquent, l'élimination incorrecte des colorants synthétiques dans les eaux usées provoque des effets toxiques aigus sur la flore et la faune aquatiques, causant de graves problèmes environnementaux (Singh et *al.*, 2014).

Ces décharges colorées ont causé divers problèmes écologiques et sont dangereuses pour certains organismes, dû à leurs effets toxiques et/ou cancérigènes. Par la suite, le traitement de ces effluents s'avère impératif pour la protection de l'environnement. (Sbai et *al.*, 2016). Notamment, environ 10-15% des colorants sont perdus dans les effluents d'unités textiles, ce qui les rend très colorés (Kilany, 2017). Maas et Chaudhari (2005) a rapporté que chaque année 280 000 tonnes de colorants textiles sont entrés dans ces effluents industriels dans le monde entier (Maas et Chaudhari, 2005). Une fois qu'ils sont libérés dans des masses d'eau, elles causent des problèmes environnementaux où ils affectent la transparence de l'eau, la solubilité du gaz, la perméation de l'oxygène et de la lumière solaire nécessaire pour la survie de diverses formes aquatiques (Crini, 2006).

### **I.5 Colorants synthétiques :**

Un colorant est une substance colorée qui interagit avec le milieu dans lequel elle est introduite, et le colore en s'y dissolvant et en s'y dispersant lui conférant la propriété de teindre (Sbai et *al.*, 2016). Cette propriété résulte d'une affinité particulière entre le colorant et la fibre. (Ben Mansour et *al.*, 2011)

En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants synthétiques doivent répondre à un certain nombre de critères: résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment aux détergents) et aux attaques microbiennes (Guivarch et *al.*, 2004).

### **I.6 Classification des colorants :**

Les colorants synthétiques sont classés selon leur structure chimique et leur méthode d'application aux différents substrats (textiles, papier, cuir, matières plastiques, etc.).

Le classement selon la structure chimique repose sur la nature du groupe chromophore. Selon la classification chimique, les principaux groupes sont regroupés dans le Tableau I :

**Tableau I:** Classification chimique des colorants.

<b>Colorants</b>	<b>Caractéristiques et propriétés générales</b>
Azoïques	<ul style="list-style-type: none"><li>- Présence du groupe fonctionnel AZO (<math>-N=N-</math>) qui peut être répété plusieurs fois dans la molécule pour former les diazoïques, trisazoïques, etc...;</li><li>- Toxiques, cancérigènes ;</li><li>- Constituent 50 % de la production mondiale des colorants;</li><li>- Se répartissent en colorants acides, basiques, directs et réactifs solubles dans l'eau ...etc.</li></ul>
Anthraquinoniques	<ul style="list-style-type: none"><li>- Les plus importants après les colorants azoïques;</li><li>- Forme générale dérivée de l'anthracène;</li><li>- Leur chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amino;</li><li>- Couvrent toute la gamme de nuances jaune-orange-rouge;</li><li>- Solidité à la lumière et vivacité des coloris surtout dans le bleu et le turquoise</li></ul>
Indigoïdes	<ul style="list-style-type: none"><li>- Forme générale dérivée de l'indigo;</li><li>- Résistance remarquable aux traitements de lavage;</li></ul>
Polyméthiniques	<ul style="list-style-type: none"><li>- Présence de groupements hétérocycliques donneurs et accepteurs d'électrons aux extrémités d'une chaîne polyméthiniques;</li><li>- Faible résistance à la lumière et bons sensibilisateurs photographiques (particulièrement les cyanines).</li></ul>
Nitrés et nitrosés	<ul style="list-style-type: none"><li>- Présence d'un groupe nitro (<math>-NO_2</math>) en position ortho par rapport à un groupement électrodonneur (hydroxyle ou groupes aminés);</li><li>- Structure simple, très limité en nombre et relativement pas cher.</li></ul>
Xanthènes	<ul style="list-style-type: none"><li>- Intense fluorescence;</li><li>- Marqueurs lors d'accident maritime ou traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines.</li></ul>
Thiazines	<ul style="list-style-type: none"><li>-Présence d'un anneau de quatre carbones, un azote et un atome de soufre</li></ul>
Phtalocyanines	<ul style="list-style-type: none"><li>- Structure complexe basée sur l'atome central de cuivre ;</li><li>- Employés dans l'industrie de pigments pour peinture et dans la teinture des fibres textiles</li></ul>

Selon la classification tinctoriale, on distingue différentes catégories tinctoriales définies cette fois par les auxochromes .Les principaux groupes de cette classification sont rassemblés dans le Tableau II.

**Tableau II:** Classification tinctoriale des colorants.

<b>Colorants</b>	<b>Caractéristiques et propriétés générales</b>
Directs	<ul style="list-style-type: none"><li>- Capables de former des charges positives ou négatives électrostatiquement attirées par les charges des fibres;</li><li>- Affinité élevée pour les fibres cellulosiques sans application de mordant (teindre directement le coton);</li><li>- Prix modéré, facilité d'application et faible solidité aux traitements de lavage.</li></ul>
Colorants de cuve	<ul style="list-style-type: none"><li>- Insolubles dans l'eau;</li><li>- Utilisés pour l'application de l'indigo qui nécessite la préparation d'une cuve de bonne résistance aux agents de dégradation</li></ul>
Réactifs	<ul style="list-style-type: none"><li>- Présence de groupes chromophores issus essentiellement des familles azoïques, anthraquinoniques et phtalocyanines;</li><li>- Présence d'une fonction chimique réactive de type triazinique ou vinylsulfone assurant la formation d'une liaison covalente forte avec les fibres;</li><li>- Solubles dans l'eau</li></ul>
Colorants à mordant	<ul style="list-style-type: none"><li>-Présence d'un ligand fonctionnel capable de réagir fortement avec un sel d'aluminium, de chrome, de cobalt, de cuivre, de nickel ou de fer pour donner différents complexes colorés avec le textile</li></ul>
Basiques ou cationiques	<ul style="list-style-type: none"><li>- Solubles dans l'eau (car ils sont des sels d'amines organiques);</li><li>- Forment des liaisons entre leurs sites cationiques et les sites anioniques des fibres;</li><li>- Faible résistance à la lumière.</li></ul>
Acides ou anioniques	<ul style="list-style-type: none"><li>- Solubles dans l'eau grâce à leurs groupes sulfonates ou carboxylates;</li><li>- Affinité élevée aux fibres textiles;</li><li>- Permettent de teindre les fibres animales (laine et soie) et quelques fibres acryliques modifiées (nylon, polyamide).</li></ul>
Dispersés	<ul style="list-style-type: none"><li>- Très peu solubles dans l'eau;</li><li>- Application sous forme d'une fine poudre dispersée dans le bain de teinture.</li></ul>

### **I.7 Colorants azoïques :**

Les colorants azoïques sont les plus communément utilisés en raison de la présence du groupe azo (-N=N-) qui confère à ces produits chimiques, une certaine résistance à la lumière, aux acides, aux bases et à l'oxygène, propriétés souhaitées pour les vêtements, (Wang, 2001; Shu et Chang, 2005).

Ils constituent la famille la plus importante des colorants de synthèse. Ils sont caractérisés par la présence du groupe  $-N=N-$ , et leur couleur est liée aux chromophores associés à cette liaison (Belhadj, 2007). Suivant le nombre des chromophores azo rencontrés dans la molécule, on distingue les monoazoïques, diazoïques et les polyazoïques.

Les colorants azoïques constituent la famille la plus importante tant sur le plan de l'application, puisqu'ils représentent plus de 50% de la production mondiale de matières colorantes (Depa, 2001 ; Bauer et *al.*, 2001) que sur celui de la multiplicité des structures étudiées. Les colorants azoïques se répartissent en plusieurs catégories : les colorants basiques, acides, directs et réactifs solubles dans l'eau, les azoïques dispersés et à mordant non ioniques insolubles dans l'eau. Il est estimé que 10 - 15 % des quantités initiales sont perdues durant les procédures de teinture et sont évacués sans traitement préalable dans les effluents (Bauer et *al.*, 2001).

## **I.8 Toxicité des colorants :**

La toxicité des différents types de colorants (mortalité, effet mutagénique et cancérigène) a été étudiée par plusieurs travaux de recherche aussi bien sur des organismes aquatiques (poisson, algue, bactéries, etc.) que sur les mammifères. En outre, des recherches ont été effectuées pour étudier l'effet des colorants sur l'activité des bactéries aérobies et anaérobies dans des systèmes de traitement des eaux résiduaires (Oubagha, 2011).

Beaucoup d'études ont montré les effets toxiques et/ou carcinogéniques des colorants azoïques, ce qui signifie que les effluents contenant ces colorants doivent être traités avant d'être rejetés en milieu naturel. Leur toxicité est en fait due à la teneur en groupements cancérigènes tels que les groupements aromatiques, cyanurés, sel de barium et de plomb. Ces groupements cancérigènes (sous forme électrophile ou radicalaire) attaquent les bases pyrimidiques de l'ADN et de l'ARN et causent par conséquent, une altération du code génétique avec mutation et risque de cancer (Oubagha, 2011).

### **I.8.1 Toxicité des colorants azoïques :**

Les colorants azoïques sont caractérisés par la présence de groupe azo ( $-N=N-$ ). La rupture des liaisons azoïques de ces dernières entraîne la formation d'amines primaires qui causent la méthémoglobinémie, caractérisée par un empêchement du transport d'oxygène dans le sang (Oubagha, 2011).

La toxicité des azoïques par exposition aux colorants et à leurs métabolites n'est pas un fait nouveau. Dès 1895, l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques. Depuis, les travaux effectués sur ces colorants ont démontré que ces composés chimiques présentaient des effets cancérigènes pour l'homme et l'animal. (Ben Mansour *et al.*, 2011).

Les effets cancérigènes des composés azoïques s'expriment par leurs dérivés amines. La toxicité des azoïques est accrue par la présence de substituants sur le noyau aromatique notamment des groupes nitro (-NO<sub>2</sub>) et halogènes (particulièrement le Chlore). (Guivarch *et al.*, 2004) Selon l'EPA, l'estimation des risques de cancer impose de fixer une concentration limite de 3,1µg/L en colorant azoïque dans l'eau potable (Oubagha, 2011).

## **I.9 Traitement des rejets colorés :**

### **I.9.1 Méthodes chimiques :**

Les techniques d'oxydation chimique sont utilisées le traitement des composés organiques en faibles concentrations, et quand les procédés biologiques sont inefficaces.

- Les procédés classiques d'oxydation chimique : sont fondés sur l'addition d'un agent oxydant dans la solution à traiter, dont les plus utilisées sont (Cl<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) (Ben Mansour *et al.*, 2011; Maba, 2014)
- Les procédés d'oxydation avancée (POA) : sont basés sur la génération d'une entité radicalaire très réactive et très oxydante, les radicaux hydroxyles •OH (Hammami, 2008; Zaviska, 2009).

### **I.9.2 Méthodes physiques :**

- **Filtration sur membrane :**

La filtration sur membrane se fait par pression hydraulique, débute par la microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse (Ben Mansour *et al.*, 2011). La nano filtration et l'osmose inverse sont les plus adaptés à la réduction partielle de la couleur (Maba, 2014).

- **Adsorption (sur charbon actif) :**

L'adsorption transfère le colorant de la phase liquide vers la phase solide. Le charbon activé est le plus utilisé pour l'élimination de la couleur (Hammami, 2008 ; Ben Mansour *et al.*, 2011).

- **Coagulation – floculation :**

La coagulation-floculation est l'une des méthodes les plus efficaces pour éliminer les matières en suspension. Elle consiste à traiter les solutions avec des produits tensioactifs ou certains coagulants inorganiques tels que l'alun (Sbai et *al.*, 2016 ; Maba, 2014). Les traitements physico-chimiques traditionnels (adsorption, coagulation/floculation, précipitation etc.) sont couramment utilisés pour la dépollution des effluents industriels; bien qu'elles soient rapides, Ces techniques ne neutralise pas la toxicité mais sont la minimisé (Govindan et *al.*, 2016). Ces méthodes s'avèrent généralement peu efficaces en regard des normes exigées sur les rejets. Elles sont très coûteuses et chargent les rejets finaux en nombreux produits chimiques. Il apparaît donc intéressant de mettre au point des traitements alternatifs, notamment par voie biologique, qui ont l'avantage d'être moins coûteux, moins polluants et plus efficaces car plus spécifiques (Moutaouakil *et al.*, 2004).

### **I.9.3 Méthodes biologiques :**

Le traitement biologique est aujourd'hui considéré comme étant une des meilleurs technologies disponibles pour le traitement des eaux usées (Gernjak et *al.*, 2006).

En raison de leurs faibles coûts et des besoins énergétiques, les traitements biologiques ont été largement utilisés pour traiter les eaux usées contenant des colorants azoïques. (Xinying et *al.*, 2017). Le traitement biologique est basé sur la biodégradation qui est un processus plus important dans la dépollution de l'environnement marin. Les microorganismes en sont responsables ; en particulier les bactéries.

### **I.10 Biodégradation des colorants :**

La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant en différents sous produits par l'action des microorganismes. Ce phénomène peut s'effectuer à n'importe quel milieu (sol ; eau) ainsi que dans différentes phases du polluant (liquide ; solide ; gazeuse).

La biodégradation est un phénomène naturel. Elle est le résultat de la dégradation de molécules organiques par les microorganismes (bactéries ; champignons ; levures ...) dont la croissance s'effectue par l'oxydation du carbone qui est utilisé comme source d'énergie. Cette réaction met en jeu deux autres éléments, l'azote et le phosphore, qui participent à la synthèse protéique, lorsque l'oxydant est représenté par l'oxygène ; on parle de condition

d'aérobiose. Dans le cas d'anaérobiose, l'oxygène est remplacé par les nitrates, sulfates ou méthane (Bekennich, 2014)

Nombreux groupes des microorganismes sont responsables de la dégradation des colorants, inclus les bactéries, les champignons, les levures, et les algues (Sudha et *al.*, 2018).

### **I.10.1 Biodégradation par les champignons :**

Les champignons sont les premiers microorganismes identifiés capables de dégrader les colorants synthétiques, et sont montrés efficaces dans certains cas comparés aux autres microorganismes (Ben Mansour et *al.*, 2011).

Les champignons ligninolytiques ont une activité sur les colorants plus que les autres champignons (Govindan et *al.*, 2016).

Les champignons éliminent les complexes organiques soit par adsorption ou par dégradation partielle ou complète (minéralisation). Cette dégradation se fait par la production d'enzymes ligninolytiques extracellulaires comme la laccase, manganèse peroxydase, la lignine peroxydase, et l'azoréductase. (Govindan et *al.*, 2016). Les champignons lignivores ont réussi à dégrader les colorants azoïques suite à l'action de la peroxydase (Palmieri et *al.*, 2005).

Les amines et les phénols aromatiques sont des métabolites intermédiaires très toxiques produits lors de dégradation des colorants. Les champignons sont capable de minéralisés et transforment ces intermédiaires de décolonisations en des composés non toxique (Kumar et *al.*, 2016 ; Krishnamoorthy et *al.*, 2018).

*Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Trametes versicolor*, *Fungalina trogii*, *Penicillium gastrivorus*, *Rhizopus oryzae*, *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, *Pycnoporus sanguineus* *Aspergillus flavus*, et *Aspergillus niger*, sont des espèces qui sont capable de dégrader les colorants azoïques (Govindan et *al.*, 2016).

### **I.10.2 Biodégradation par les levures :**

La cultivation et la manipulation des levures est très difficile. Leurs activité sur les colorants est très faible, et dépend une longue durée (Ben Mansour et *al.*, 2011).

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 capable de cliver la bande azoïque de méthyle rouge, et le dégrader totalement dans 12 heures (Simin et *al.*, 2017).



### **I.10.3 Biodégradation par les algues :**

Les études portant sur la dégradation des colorants par des algues sont très limitées. Une étude réalisée par Jinqi et Houtian (1992) a montré que les espèces *Chlorella*, *Oscillatoria* et *Spirogyra* étaient capables de dégrader les colorants azoïques. Leur action décolorante dérive de l'expression d'une azoréductase (enzyme responsable de la fission de la liaison azote-azote) aboutissant à la production des amines aromatiques correspondantes qui sont par la suite complètement oxydées (Ben Mansour et al., 2011)

### **I.10.4 Biodégradation par les Actinomycètes :**

Les actinomycètes ont une capacité de dégrader les colorants azoïques moins que les champignons et les bactéries, exemple: *Streptomyces chromofcesus* (Govindan et al., 2016).

Les actinomycètes produisent des enzymes extracellulaire « les peroxydases », pour l'oxydation de la lignine et pour la production des composés polymères hydrosolubles (Ben Mansour et al., 2011).

### **I.10.5 Biodégradation par les bactéries :**

Nombreuses bactéries aérobies et anaérobies sont capable de dégradées de divers colorants (Sudha et al., 2018). on y distingue des bactéries, strictement anaérobies (*Bacteroides sp.*, *Eubacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Fusobacterium sp.*, etc.), anaérobies/aérobies facultatives (*Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis*, etc.) et aérobies (*Bacillus sp.*, *Aeromonas hydrophia*, *Pseudomonas sp.*, etc.).

Contrairement aux champignons et aux actinomycètes ; les bactéries dégradent les colorants par voie intracellulaire (Ben Mansour et al., 2011).

Les bactéries utilisent les colorants azoïques comme seule source de nutriment. Elles produisent l'azoréductase, qui transforme le colorant azoïque en métabolite non toxique, qui est par la suite minéralisé (Sudha et al., 2018).

#### **I.10.5.1 Mécanisme de biodégradation des colorants azoïques par les bactéries :**

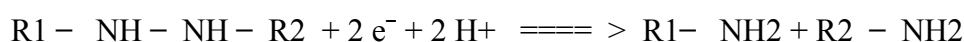
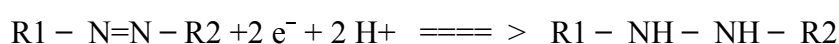
La minéralisation des colorants azoïques se fait en 2 étapes successives, après que le colorant sera transformé à l'intérieur de la cellule bactérienne (Ben Mansour et al., 2011):

- **Décoloration des colorants azoïques dans les conditions anaérobies :**

Malgré la présence de l'oxygène, la dégradation initiale des colorants semble être une réduction de la liaison azoïque -N=N- par un azoréductase insensible à l'oxygène (Pandey *et al.*, 2006 )

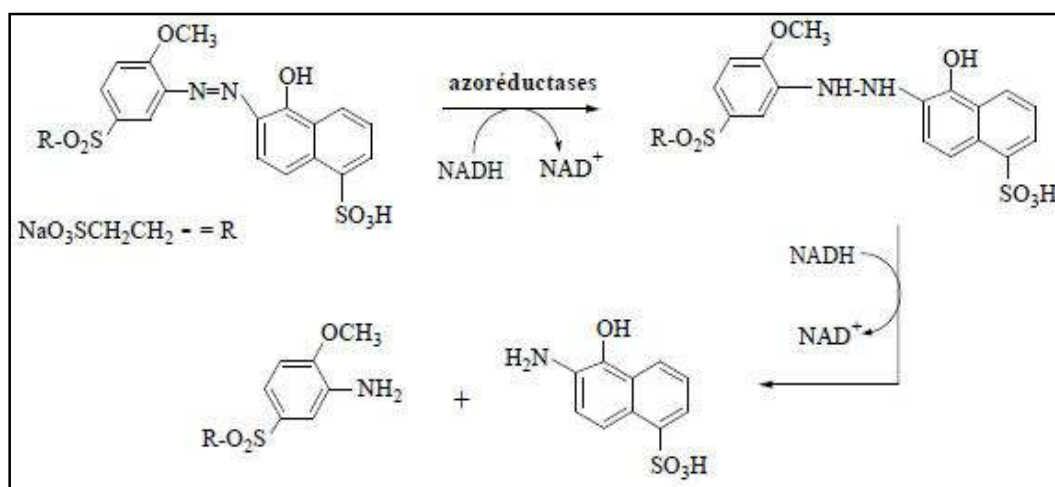
L'azoréduction anaérobie est l'étape clé de la minéralisation des colorants. Les bactéries produisent une enzyme cytoplasmique non spécifique l'azoréductase, qui clive la double liaison azoïque (-N=N-) (Santos *et al.*, 2007; Ben Mansour *et al.*, 2011 ).

Cette processus nécessite un transfère de 4 électrons en deux étapes. Dans chaque étape le colorant azoïque accepte 2 électrons (accepteur final d'électrons) (Ben Mansour *et al.*, 2011).



(Amines aromatiques incolores)

Les cofacteurs NADH, NADPH, ou FMN sont des donneurs d'électrons nécessaires à l'action de l'azoréductase (Ben Mansour *et al.*, 2011).



**Figure 1** : Réduction du rouge réactif 22 par *Pseudomonas luteola* (Chang *et al.*, 2001)

La réduction dans les conditions anaérobies semble être non spécifique, comme la plupart d'un groupe varié de composés azoïques est décolorés. Bien que le taux de décoloration soit dépend de la source de carbone organique ajouté, ainsi que la structure du colorant a dégradé (Bromly *et al.*, 2000 ; Stolz, 2001).

Ainsi, la réduction anaérobie du colorant est un processus fortuit, où la teinture pourrait agir comme un accepteur d'électrons fournis par les transporteurs de la chaîne de transport

d'électrons (Pandey *et al.*, 2006).

Les amines aromatiques formés lors de l'azoréduction sont généralement incolores, et sont oxydées en présence d'oxygène (Ben Mansour *et al.*, 2011). Les amines qui résistent à l'oxydation sont rejetées dans le milieu extérieur (Hsueh et Chen, 2007).

▪ **Dégradation des colorants azoïques par la succession anaérobie/aérobie :**

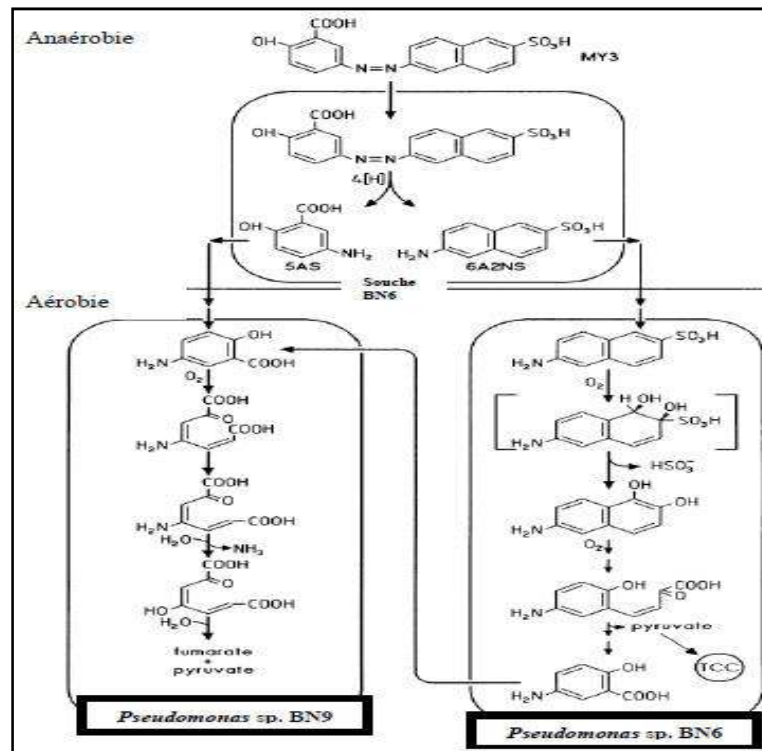
La dégradation des colorants azoïques par des bactéries dans des conditions limitées ou dépourvues en oxygène présente l'inconvénient d'accumuler des azo-produits (amines) qui sont la plupart du temps très toxiques, voire cancérigènes (Hsueh et Chen, 2007).

L'oxydation de ces amines aromatiques par les bactéries nécessite la présence d'oxygène, qui est un facteur limitant de l'azoréduction. Les chercheurs ont tenté de résoudre ce problème en combinant la biodégradation anaérobie et aérobie de manière à minéraliser complètement les colorants azoïques. Deux méthodes ont été alors étudiées :

- **Un système de réacteur séquentiel anaérobie/aérobie :** Dans ce système, les colorants azoïques sont exposés en présence de la bactérie étudiée, dans un premier temps à des conditions anaérobie, puis dans un deuxième temps, à des conditions aérobie (Basibuyuk et Forster, 1997; O'Neill *et al.*, 1999).

Cependant, les colorants azoïques n'ont jamais été minéralisés de façon satisfaisante dans la majorité des cas étudiés. Les amines aromatiques formées lors de la première étape de la biodégradation (azoréduction) s'accumulent dans le milieu extracellulaire et résistent à la bio-oxydation. La dégradation des amines aromatiques, en particulier celle des amines sulfoniques, est limitée, voire inhibée par leur faible transfert à travers la membrane cellulaire (Tan *et al.*, 2005).

Parmi de nombreuses études, signalons la seule réalisée avec un consortium formé de deux *Pseudomonas* (Figure 2), qui fait l'exception et qui a abouti à la minéralisation totale du Jaune mordant 3 (Haug *et al.*, 1991).



**Figure 2** : Minéralisation du colorant azoïque jaune mordant 3 (MY3) à l'aide d'un système de réacteur séquentiel anaérobie/aérobie (Haug *et al.*, 1991).

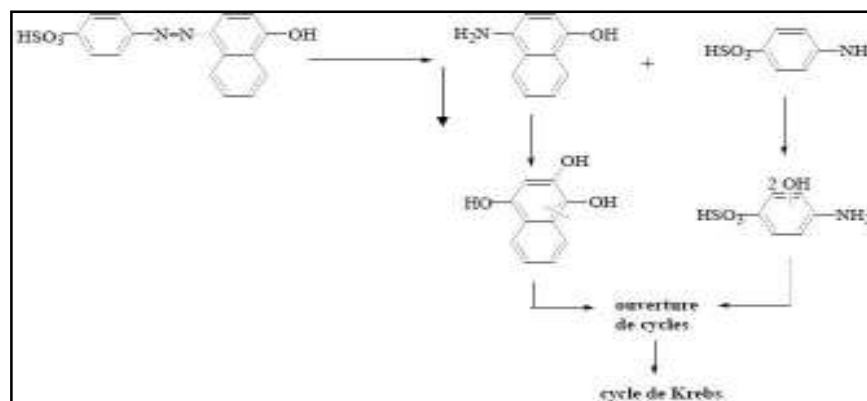
- **Un système de réacteur anaérobie/aérobie intégré** : Dans ce système, des microorganismes anaérobie et aérobie peuvent collaborer pour une minéralisation des colorants azoïques (Libra *et al.*, 2004; Van DER Zee et Villaverde, 2005). Un des problèmes majeurs est le déséquilibre entre le cosubstrat et l'oxygène; ceci est susceptible d'inhiber, notamment dans l'étape aérobie, la dégradation des amines aromatiques.
- **Décoloration des colorants azoïques dans des conditions oxygénées** :

Si la biodégradation des colorants azoïques dans des conditions anaérobie a été très largement étudiée, la biodégradation en culture aérée (bien oxygénée) reste encore peu étudiée et limitée à certaines espèces de bactéries.

Ces bactéries sont capables d'utiliser les amines aromatiques formées comme sources uniques de carbone d'énergie pour leur croissance. aboutissant ainsi à une dégradation complète ou « minéralisation » des colorants azoïques (Pandey *et al.*, 2006 ). Ces bactéries dégradent les molécules colorantes par la succession de deux étapes enzymatiques :

- une azoréduction par un azoréductases non sensible à l'oxygène qui clive la liaison -N=N- aboutissant à la formation des amines aromatiques.
- Après l'azoréduction vient l'oxydation : les amines aromatiques issues de l'azoréduction sont directement prises en charge par un système de cascade enzymatique impliquant des oxygénases et aboutissant à leur dégradation totale (minéralisation). (Nachiar et Rajakumar, 2004)

Les *Pseudomonas* sont les plus citées et ont montré une grande aptitude à la conversion aérobie de colorants azoïques. exemples des souches bactériennes avec se caractère: *Xenophilus azovorans* KF 46 (anciennement *Pseudomonas sp.K24*) et *Pigmentiphaga kullae* K24 (précédemment *Pseudomonas sp.K24*) qui peut se développer en aérobie l'orange I (Pandey et *al.*, 2006 ).



**Figure 3** : Mécanisme de dégradation de l'acide orange 20 par *Pseudomonas* K24 (Kulla et *al.*, 1983).

### **I.11 Influence des paramètres physico-chimiques sur la cinétique de la biodégradation :**

L'élimination des colorants est influencée par plusieurs facteurs, qui ont un effet sur les conditions de croissance microbienne et liés aux caractéristiques de colorant ou des eaux usées (Satyendra et Manikant, 2017).

#### **I.11.1 Effet de l'oxygène et de l'agitation :**

L'oxygène est un facteur limitant de la biodégradation des colorants azoïques (Ben Mansour et *al.*, 2011). Ceci est attribué au fait que les électrons libérés par l'oxydation des donneurs d'électrons sont préférentiellement utilisés par l'oxygène (qui est un accepteur d'électron à potentiel d'oxydoréduction élevé) plutôt que par le colorant azoïque (Satyendra et Manikant, 2017).

L'azoréductase est inhibé par l'oxygène, à cause de la concurrence prédominante pour l'utilisation de NADH par la respiration aérobie, car le NADH agit comme un donneur d'électrons pour le clivage de la liaison azoïque lors de biodégradation (Thao et *al.*, 2013).

Selon Saratale et al. (2011) la décoloration des colorants azoïques été supérieur dans des conditions strictement anaérobies, que dans des conditions semi-anaérobies. La pauvre décoloration des colorants obtenus dans des conditions statiques pourrait être attribuée à la limitation de l'oxygène nécessaire pour la dégradation oxydative (Chimezie et Thomas, 2011).

Selon Satyendra et Manikant (2017) dans des conditions d'agitation, la présence d'oxygène prive l'azoréductase de la réception des électrons nécessaire au clivage de la liaison azoïque, alors que dans des conditions statiques ces électrons sont facilement disponibles pour les enzymes du NADH pour la décoloration des colorants azoïques. Et par conséquent, les microbes possèdent plus d'un mécanisme de décoloration.

Pour un traitement efficace des eaux usées textiles, un processus en deux étapes est nécessaire dans lequel l'oxygène est introduit après la décoloration anaérobie initiale du colorant azoïque (Saratale et *al.*, 2011 ; Satyendra et Manikant, 2017).

#### **I.11.2 Effet de source de carbone et d'azote supplémentaire :**

La dégradation des colorants azoïques par les bactéries dépend généralement des sources organiques complexes, telles que l'extrait de levure, peptone, ou une combinaison de sources organiques complexes et l'hydrates de carbone comme le glucose, le saccharose et l'amidon, car ils sont considérés comme des donneur d'électrons (Saratale et *al.*, 2011).

Selon Satyendra et Manikant (2017) l'ajout de donneurs d'électrons, telle que les ions glucose ou acétate stimule la réduction du clivage des liaisons azoïques.

Certaines études ont effectué la décoloration du colorant azoïque en présence de sources supplémentaires de carbone et d'azote. Dans ceux-ci, l'ajout des sources de carbone semblaient moins efficaces pour promouvoir la décoloration, probablement en raison de la préférence des cellules assimiler les sources de carbone supplémentaires sur l'utilisation du colorant comme source de carbone (Saratale et *al.*, 2011).

Selon Ben Mansour et *al.* (2011) le glucose a un effet négatif sur la biodégradation, qui due soit à la chute de pH à cause de la formation d'acide, soit à une répression catabolique

exercée sur l'expression de certains gènes. En effet, le glucose inhibe la transcription des gènes AMP cycliques dépendants dont font partie les gènes codants pour les azoréductases. En l'absence de cosubstrat, la culture bactérienne montrée des taux de décoloration réduits, dont la disponibilité d'une source de carbone supplémentaire responsable à la génération de molécules NADH qui est nécessaire pour la croissance et la décoloration des colorants (Chimezie et Thomas, 2011).

Le faible degré de décoloration à un niveau de glucose inférieur à l'optimum pourrait être dû à une concentration insuffisante de glucose pour répondre à l'exigence de croissance pour l'élimination de la couleur. Tandis que, à une concentration en glucose supérieure à la concentration optimale, les cellules bactériennes pourraient utiliser préférentiellement le glucose pour d'autres activités métaboliques, ce qui se traduit par une diminution de la décoloration du colorant (Satyendra et Manikant, 2017).

La régénération du donneur d'électrons NADH, cofacteur de l'azoréduction, nécessite une source d'azote comme de l'extrait de levure, de la peptone, extrait de bœuf, l'urée, du tryptone, du  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4 \text{Cl}$  (Saratale et *al.*, 2011 ; Ben Mansour et *al.*, 2011).

Le peptone s'est révélée comme la meilleure source d'azote (Satyendra et Manikant, 2017) pour la régénération de NADH, alors que le  $\text{KNO}_3$  limite la cinétique de décoloration et inhibe complètement celle-ci à des concentrations élevées.

L'effet inhibiteur du  $\text{KNO}_3$  sur la décoloration dans des conditions anaérobies ou limitées en oxygène a été expliqué par le fait que l'ion nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), et sa forme réduite le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), sont utilisés par la souche bactérienne comme des accepteurs d'électrons. Ces derniers entrent en compétition avec l'azoréduction comme accepteurs finaux des électrons (Ben Mansour et *al.*, 2011).

### **I.11.3 Effet de la concentration de colorant sur la décoloration :**

La concentration du colorant influence sur l'efficacité de leur élimination. Les colorants sont éliminés facilement lorsque la concentration se situe entre 1 et 10  $\mu\text{M}$ , et sera réduit à la concentration 30  $\mu\text{M}$  (Satyendra et Manikant, 2017).

L'augmentation de la concentration du colorant diminue progressivement le taux de décoloration, en raison de blocage des sites actifs de l'azoréductase (Saratale et *al.*, 2011), ou à l'effet toxique des colorants sur la bactérie (l'inhibition du métabolisme, l'activité, et la croissance cellulaire) (Chimezie et Thomas, 2011).

La dégradation des colorants azoïques par des bactéries dans des conditions limitées ou dépourvues en oxygène présente l'inconvénient d'accumuler des azo-produits (amines) qui sont la plupart du temps très toxiques (Hsueh et Chen, 2007). Cela est remarqué par une vitesse d'élimination rapide pendant la période d'incubation initiale, suivi par une diminution rapide, il ya alors une relation entre la concentration du colorant et le temps requis pour sa décoloration (Satyendra et Manikant, 2017).

#### **I.11.4 Effet de température :**

La température affecte le métabolisme bactérien, le taux de croissance microbienne et l'état physiologique des polluants (Satyendra et Manikant, 2017).

L'activité décolorante la plus importante est obtenue pour la température optimale de la croissance de la bactérie (Ben Mansour et *al.*, 2011). La température optimale pour l'activité bactérienne était de 35 ° C. L'augmentation supplémentaire de la température au-delà provoquer une réduction marginale de la décoloration du colorant (Chimezie et Thomas, 2011). Cela peut être attribuée à la perte ou la diminution de la viabilité cellulaire et/ ou à la dénaturation de l'enzyme azoréductase (Saratale et *al.*, 2011).

La diminution de la température tue rarement les microbes, qui sont récupérés avec un réchauffement.

La température peut affecter la stabilité de la paroi de la cellule microbienne et sa configuration, et peut provoquer l'ionisation des groupements chimiques (Satyendra et Manikant, 2017).

#### **I.11.5 Effet de pH:**

Le pH de milieu est un autre facteur qui influe la biodégradation. Le taux d'élimination des couleurs est plus élevé au pH optimal (Saratale et *al.*, 2011), dont le pH neutre (7) était le meilleur pour la dégradation des colorants (Chimezie et Thomas, 2011).

L'augmentation de pH des effluents colorés peut être due à la réduction biologique de la liaison azoïque des colorants, par la formation des amines aromatiques, qui sont plus basiques que le composé originale (Satyendra et Manikant, 2017).

La dégradation des colorants est affectée si le pH des eaux usées devient fortement acide ou fortement alcalin (Sudhaa et *al.*, 2018). Cette affection peuvent être liés a l'influence sur le transport de molécules du colorant à travers la membrane cellulaire, qui est considéré



comme le limitant étape pour la décoloration (Saratale et *al.*, 2011 ; Mesbaiah et *Badis*, 2017)

La réduction de la liaison azoïque est induite par l'enzyme. Les changements de pH affectent le degré d'ionisation de l'enzyme conduisant à une altération de la conformation de protéine affectant finalement l'activité enzymatique (Satyendra et Manikant, 2017).

#### **I.11.6 Effet de la structure de colorant :**

La réduction de la liaison azoïque dépend de la structure chimique des colorants azoïques, où certains colorants sont plus résistants à l'élimination par les cellules microbiennes (Ben Mansour et *al.*, 2011 ; Satyendra et Manikant, 2017). Les colorants qui ont une structure simple et un poids moléculaire faible sont décolorés plus rapidement que ceux qui ont une structure complexe (Daizong Cui et *al.*, 2014).

Les colorants monoazoïques sont dégradés plus rapidement que les colorants diazo et triazoïques (Saratale et *al.*, 2011 ; Satyendra et Manikant, 2017).

Selon Saratale et *al.* (2011), la production de l'enzyme (azoréductase) était liée à des structures colorantes particulières. Les composés azoïques avec des groupes hydroxyle ou amin sont plus susceptibles d'être dégradés que ceux avec des groupes méthyle, méthoxy, sulfo ou nitro.

L'effet des groupes sulfonâtes sur l'élimination des colorants dépend du mécanisme de décoloration. La perméabilité des colorants sulfonés à travers la membrane cellulaire microbienne sera gênée, si la réduction du colorant est intracellulaire. Si la dégradation est extracellulaire, les groupes sulfonâtes ont un peu d'effet sur la vitesse de dégradation. Les colorants acides présentent un faible taux d'élimination des couleurs en raison du nombre de groupes sulfonâtes, car le nombre élevé de ces groupes entraîne la diminution du taux de décoloration (Lade et *al.*, 2012 ; Satyendra et Manikant, 2017).

## II.1 Lieu d'étude :

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'analyses biologiques de Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et d'Aquaculture « CNRDPA », Bouismail-Tipaza. Durant une période de 6 mois.

## II.2 Matériels :

### II.2.1 Produits utilisés :

Produits chimiques	Milieux de culture	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"><li>- Méthyle orange</li><li>- Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</li><li>- Sulfate ferreux (FeSO<sub>4</sub> ; 7H<sub>2</sub>O)</li><li>- NaCl ; KCl; MgSO<sub>4</sub></li><li>- NH<sub>4</sub>Cl ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Gélose nutritive</li><li>- Milieu VF (viande fois)</li><li>- Milieu TSI (Triple Sugar Iron)</li><li>- Milieu mannitol mobilité</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Violet de Gentiane</li><li>- Lugol ; Alcool 90</li><li>- Fuschine</li><li>- Réactif de Kovacs ; VP1, VP2</li><li>- Huile à immersion.</li></ul>

### II.2.2 Matériels utilisés :

Dans cette étude, les mesures de spectrophotométrie UV et visible ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis. qui permet de suivre la décoloration des solutions grâce aux absorbances qui évoluent en fonction du temps de traitement.

## II.3 Méthodologie expérimentale :

### II.3.1 Isolement des souches :

Dans cette partie du travail nous avons utilisé des microorganismes isolés localement à partir d'un rejet industriel/ urbain à Bou-Ismaïl. La figure 4 montre le biotope utilisé pour l'isolement.




Figure 4 : Biotope d'isolement.

Le milieu utilisé pour l'isolement est un milieu minimum à base des sels :  $\text{NH}_4\text{Cl}$  : 0,5 ;  $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$  : 0,2 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,4 ;  $\text{FeSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,1 (g/l) et 5 ml d'effluent, le Méthyle orange est ajouté comme source de carbone et d'énergie avec une concentration de 50 mg/l. L'incubation a été effectuée à 35°C.

Le tableau III regroupe les caractéristiques du colorant utilisé.

**Tableau III:** Propriétés physico-chimiques du Méthyle orange.

Nom	Famille	Formule brute	Masse molaire	Solubilité dans l'eau	$\lambda$ max (nm)	Pka	Structure
Méthyle Orange	Azoïque	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$	327,33	5,20 à 20 °C	465	3.4	

### II.3.2 Sélection de la souche performante :

Les colonies avec une large zone de décoloration sont inoculées dans un milieu liquide avec le méthyle orange comme source de carbone. la souche qu'a montrée une activité rapide a été sélectionnée comme souche performante et utilisé dans cette étude.

### II.3.3 Identification de la souche performante :

#### II.3.3.1 Identification morphologique :

Après l'obtention de l'isolat à étudier, nous avons procédé à son identification selon son aspect macroscopique et microscopique.

##### II.3.3.1.1 Aspect macroscopique :

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

##### II.3.3.1.2 Aspect microscopique :

###### II.3.3.1.2.1 Etat frais :

Ce test permet de Mettre en évidence la mobilité, mode de groupement et la morphologie des bactéries. L'observation se fait au microscope photonique.

###### Technique :

- Déposer une goutte d'une culture en milieu liquide sur une lame de verre.

- Recouvrir la goutte d'une lamelle couvre objet.
- Observer immédiatement au microscope photonique (objectif x40).

### **II.3.3.1.2.2 Coloration de Gram :**

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées.

#### **Technique :**

- préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec bunsen.
- Déposer quelques gouttes de violet de gentiane.
- Laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.
- Par la suite, quelques gouttes de lugol (solution d'iode iodo-iodurée) sont déposées : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes.
- Puis, nous avons versé goutte à goutte l'alcool sur la lame avec l'alcool jusqu'à la disparition du violet.
- Enfin, nous avons ajouté une goutte de la solution de Fuchsine. Laisse agir de 30 secondes à 1 minute. Rinçage à l'eau puis séchage.
- une fois la lame séchée, Observer avec une goutte d'huile à immersion au grossissement x100 au microscope optique.

### **II.3.3.2 Tests biochimique :**

#### **II.3.3.2.1 L'étude de métabolisme respiratoire :**

Les tests effectués pour étudier le métabolisme respiratoire sont : Recherche de la catalase, recherche d'enzyme oxydase et la recherche du type respiratoire sur milieu VF (viande-fois).

##### **II.3.3.2.1.1 Test de catalase :**

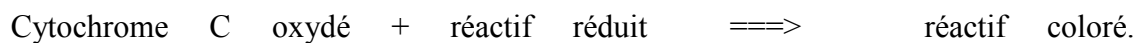
La catalase à la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne (Garnier et Denis, 2007)

Une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 10 volumes est déposée sur une lame en verre. Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocié la culture dans l'eau oxygénée

On fait la lecture immédiatement: le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase.

#### **II.3.3.2.1.2 Test de l'oxydase :**

Le test de l'oxydase met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. Ce test met en évidence la présence de cytochrome c dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome c. La réaction est schématiquement la suivante :



##### **Technique:**

la recherche de l'oxydase sera effectuée à l'aide de bandelettes "Bactident Oxydase" dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N, N-diméthyl-1,4- phénylènediaminedichlorure. Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture sur le papier filtre.

#### **II.3.3.2.1.3 Recherche du type respiratoire:**

Le milieu utilisé est la gélose VF (viande-fois), coulée dans des tubes et étroits. L'effilure d'une pipette pasteur stérilisée par flambage, est plongée dans une suspension de la bactérie à étudier. L'inoculum est transporté dans le fond du tube puis on remonte la pipette en décrivant des tours de du tube .Incubation dure 24 heures à 37°C.

##### **Lecture :**

Après incubation, on peut reconnaître trois types respiratoires :

- Bactéries aérobies strictes : croissance uniquement dans la zone superficielle de la gélose.
- Bactéries anaérobies strictes : croissance uniquement dans la zone profonde de la gélose.
- Bactéries aéro-anaérobie facultatives : croissance sur toute la hauteur de la gélose.

#### **II.3.3.2.2Mannitol-Mobilité:**

Le test permettant de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et l'étude de la mobilité de la souche. L'ensemencement du milieu s'est fait par piqûre centrale dans le culot jusqu'au fond. Incubation pendant 24 heures à 37°C.

La fermentation du mannitol se révèle par une acidification du milieu qui fait virer l'indicateur de pH au jaune. La mobilité se traduit par la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement vers la périphérie, en créant une turbidité.

### **II.3.3.2.3 Utilisation du lactose et du saccharose, fermentation du glucose et la production d'H<sub>2</sub>S (gélose TSI):**

Le TSI c'est une gélose inclinée utilisé généralement pour l'identification des Entérobactéries. On ensemence le culot par une piqure centrale et la pente par des stries longitudinales pour avoir une culture abondante, Incubation pendant 24 heures à 37°C.

### **III.3.3.3 Identification biochimique :**

Elle est réalisée par un test biochimique API 20 E qui consiste à l'identification des bactéries gram négatif.

La galerie API 20 E comprend 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API 20 E qui constitue les tests.

#### **Technique :**

Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide

Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte. Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée. Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de "suspension Medium". À l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les microtubes de la galerie. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine ; Refermer la boîte d'incubation et placer la boîte à 37 °C durant 24 heures.

#### **Lecture :**

Sortir la boîte de l'étuve et noter sur la fiche de lecture les résultats obtenus pour les tests à lecture spontané

Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs : ajouter une goutte du chaque réactif : TDA, IND, VP 1 et VP 2.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Noter les résultats sur la fiche de lecture et calculer le profil numérique

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique et d'un logiciel d'identification.

### **II.3.4 Choix de milieu de dégradation :**

Trois milieux de culture ont été testés pour étudier l'influence de la composition du milieu sur la dégradation du méthyle orange par la souche performante E4O.

- Le milieu M1 est composé de (g/l) 0,3 Glucose, 0,075 Peptone, 0,0075 Mg SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,015 KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 0,75 NaCl;
- Le milieu M2 est composé de (g/l) 0,3 Glucose, 0,3 Extrait de levure, 0,015 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,075 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,075 KCl
- le milieu M3 est composé de 2,695 Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 0,07365 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,45 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 NH<sub>4</sub>Cl, 0,0039 CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,075 NaCl. (Ghanem et *al.*, 2011; modifié).

Le méthyle orange a été ajouté dans les trois milieux avec une concentration de 50 mg/l, après incubation à 35°C ; la concentration de méthyle orange a été calculé et le milieu ou le taux de dégradation le plus élevé est enregistré est choisi pour la suite du travail.

### **II.3.5 Effet de la concentration initiale du colorant :**

La concentration initiale du Méthyle orange est un facteur très important qui affecte le processus de décoloration. Différentes concentrations ont été testées à savoir, 10, 20, 30, 40 et 50 mg/l. Les cultures ont été incubées à 35°C,

### **II.3.6 Effet de la salinité du milieu :**

Différentes concentrations de NaCl ont été testées à savoir, 0, 1, 10, 20, 30, 40 mg/l. Les cultures ont été incubées à 35°C.

### **II.3.7 Effet du pH du milieu:**

Afin d'étudier l'effet du pH sur la dégradation de méthyle orange, Les expériences de biodégradation du méthyle orange par la souche bactérienne ont été étudiées sur une gamme de pH de 5 à 10 pour une concentration de [MO] = 50 mg/L. Le pH a été ajusté à l'aide d'acide chlorhydrique HCl (0,01 M) et de la soude NaOH (0,01 M) avec un pH-mètre.

### **II.3.8 Effet de la température :**

La température d'incubation est un facteur important dans toute l'étude de la biodégradation du MO par la souche bactérienne. Pour ce fait, Les expériences de biodégradation ont été réalisées à différents températures (30, 35,44, 55 C°).

### **II.3.9 Effet de l'agitation :**

Pour la suite, Nous avons testé l'effet de l'agitation du milieu sur la biodégradation des colorants. Pour ce fait, les cultures de flacon ont été incubées à 30 °C, dans un agitateur rotatif à 160 tr / min.

### **II.3.10 Etude de la biodégradation du MO par le surnagent de la culture :**

A fin d'étudier la biodégradabilité du méthyle orange par le surnagent de la culture de la souche E4O, 1ml du surnagent a étéensemencées avec le milieu 1 contenant le colorant MO. Les cultures ont été par la suite incubées à 35C° pendant 6 jours.

### **II.3.11 Suivi de la dégradation :**

La dégradation du Méthyle orange a été suivi par la mesure de la DO du surnagent à 464 nm, par spectroscopie UV-Vis. Le pourcentage de dégradation est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Dégradation} = 100 * (A_i - A_f) / A_i$$

Ou :  $A_i$  = Absorbance initiale

$A_f$  = Absorbance finale

### **II.3.12 Etude de l'efficacité de biodégradation des colorants synthétiques par la souche E4O:**

A fin d'étudier l'efficacité de la biodégradabilité des autres colorants synthétiques par la souche E4O. On a étudié la croissance de cette dernière sur trois colorants différents à savoir le Bleu de méthylène, Vert de malachite, et le rouge de Congo.



### III.1 Isolement des souches :

Après 2 jours d'incubation des flacons qui contiennent de milieu MSM additionné de 50 ml de MO et 5ml d'effluent; un virage de couleur a été observé. Après 9 jours d'incubation ; une décoloration significative a été observé.

Le milieu MSM est dépourvu de source de carbone. Le MO est considéré comme la seule source de carbone pour les microorganismes.

La décoloration de MO est due probablement à l'utilisation de colorant comme source de carbone par les microorganismes. Pour la confirmation de cette hypothèse ; on aensemencé un milieu MSM solide à partir des milieux décolorés.

Après l'ensemencement de milieu MSM solide additionné de 6 ml de MO ; par les souches isolées sur milieu MSM liquide, nous avons noté un éclaircissement de la couleur ; une incubation de 6 jours a été effectuée à 30°C. L'observation macroscopique a montré l'apparition de différentes colonies transparentes sur le point où on a déposé la goutte ensemencée ; et sur différents endroits de la boîte.

Les colonies qui se sont développées dans le milieu MSM solide sont ensemencées séparément dans le milieu GN additionné de 5 ml de MO. Chaque colonie a été codée par un nom spécifique. Après incubation à 30°C pendant 24h ; nous avons obtenu des colonies différents. Leur morphologie a été étudiée. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Aspect macroscopique des colonies isolées sur milieu GN.

	Forme	Taille	Conteur	Opacité	Couleur	Relief	Surface	Consistance
<b>E10</b>	Circulaire	Grand	Régulière	Opaque	Blanche	Bombé	Lisse	crémeuse
<b>E20</b>	Circulaire	Moyenne	Régulière	Opaque	transparente	Bombé	Lisse	crémeuse
<b>E30</b>	Circulaire	Moyenne	Régulière	Claire	Blanche	Bombé	Lisse	crémeuse
<b>E40</b>	Circulaire	Moyenne	Régulière	Claire	Translucide	Bombé	Lisse	crémeuse
<b>E50</b>	Bacille	Petite	Régulière	+/- claire	Blanche	Profond	Lisse	crémeuse

### **III.2 Sélection de la souche performante :**

Parmi les cinq souches testées, la souche codée E4O a montré une capacité intéressante de dégrader le méthyle orange par rapport aux autres souches. Un taux de dégradation de 91% à été enregistré après 7 jours d'incubation à 35°C.

Cette souche a été choisie comme souche performante et utilisée par la suite.

### **III.3 Identification de la souche performante**

#### **III.3.1 Identification morphologique :**

##### **III.3.1.1 Aspect macroscopique :**

###### **- Forme des colonies :**

L'incubation de la souche E4O dans GN pendant 24h ; a permet l'obtention des colonies circulaires à bord régulier ; translucides ; de tailles moyennes ; bombés ; de surface lisse.

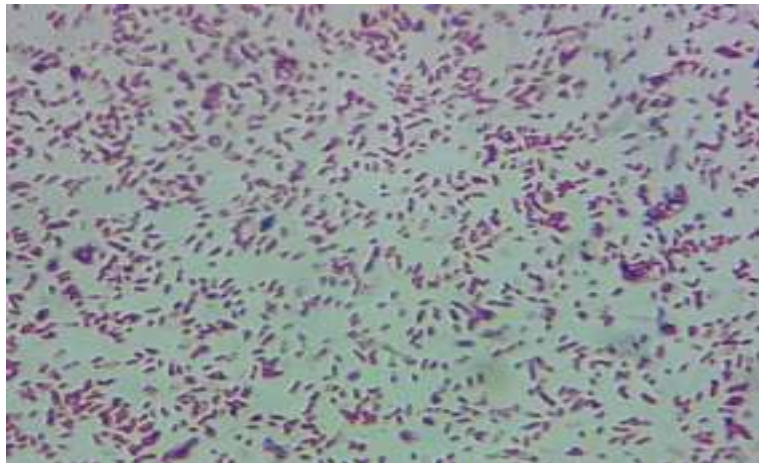
##### **III.3.1.2 Aspect microscopique :**

###### **III.3.1.2.1 Etat frais :**

L'observation au microscope optique entre lame et lamelle a permet d'observé des bactéries mobiles de forme coccobacilles.

###### **III.3.1.2.2. Coloration Gram :**

Après avoir purifié les différents isolats, la souche E4O est fixée par la coloration de Gram et observée au microscope optique au grossissement  $\times 100$  ; les cellules ont la forme de coccobacille colorées en rose. D'après la coloration rose ; la souche E4O est Gram négatif.



**Figure 5:** Résultat de la coloration de Gram de la souche E4O.

### **III.3.2 Tests biochimiques:**

#### **III.3.2.1 Test de catalase :**

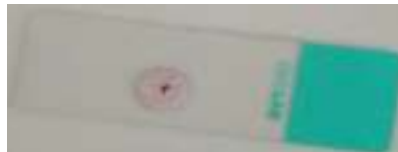
Le dégagement immédiat des bulles d'air, nous a confirmé que la souche E4O est catalase positive.



**Figure 6:** Résultat du test de catalase.

#### **III.3.2.2 Test d'oxydase :**

La présence d'une cytochrome-oxydase chez la bactérie E4O ; se traduit en 20 à 60 secondes par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé.



**Figure7 :** Oxydase positif de la souche E4O.

#### **III.3.2.3 Recherche du type respiratoire :**

Après incubation de 4 jours de milieu VF, on a observé la croissance de la bactérie E4O sur toute la hauteur de tube. Le type respiratoire de la souche bactérienne est aéro-anaérobie facultative.



**Figure 8 :** Résultat de la recherche de type respiratoire d'E4O dans le milieu VF.

#### **III.3.2.4 Fermentation des sucre (glucose ; lactose ; saccharose) et la production d'H<sub>2</sub>S (Milieu TSI):**

Après 24h d'incubation; un virage de la couleur de milieu vers le jaune a été observé. La coloration jaune de la pente a indiqué la fermentation de lactose et de saccharose. La coloration jaune de culot a expliqué la fermentation de glucose ; et que la bactérie est anaérobie facultative.

L'absence de noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pente a été expliqué par l'absence de production d'H<sub>2</sub>S



**Figure 9:** Résultat de la recherche de fermentation des de sucre dans le milieu TSI

#### **III.3.2.5 Mannitol-mobilité:**

Après 24h d'incubation à 37°C ; un virage de la couleur de milieu mannitol mobilité vers le jaune a été observé. La bactérie E4O est capable de dégrader le mannitol. La mobilité se traduit par la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement vers la périphérie.

Une diffusion de la bactérie a été observée à partir de la ligne d'ensemencement vers la périphérie ; en créant une turbidité, et donc la souche E4O est mobile.

#### **III.3.2.6 Identification biochimique (Galerie Api 20 E):**

L'incubation de la galerie à 37°C pendant 24 h ; a permis aux enzymes bactériennes de réagit avec le substrat de chaque cupule. L'ajout des réactifs TDA ; IND ; VP 1 ; et VP 2 aux cupules convenables a montré le résultat du tableau V.

Après la notification des réactions positifs et négatifs ; on a obtenu le code d'identification 3246124. A partir de ce code et de catalogue analytique ; on a confirmé que la bactérie E4O est *Aeromonas hydrophila*.

Tableau V: Résultats de la galerie Api 20E de la souche E4O

Api 20 E	E4O
ONPG: 2-nitrophenyl – BD- galactopyranoside	+
ADH: L-arginine déshydrogénase	+
LCD: L- lysine décarboxylase	-
ODC: L – ornithine décarboxylase	-
CIT: trisodium citrate	+
H <sub>2</sub> S: Sodium thiosulfate	-
URE: urée	-
TDA: L-tryptophane décarboxylase	-
IND: production d'indole	+
VP: Sodium pyruvate	-
GEL: gélatine (origine bovin)	+
GLU : D- glucose	+
MAN: D- mannitol	+
INO: inositol	-
SOR: D –sorbitol	-
RHA: L –rhamnose	-
SAC: D- saccharose	+
MEL: D-melibiose	-
AMY: amygdaline	-
ARA: L- arabinose	-

#### III.4 Effet de la composition du milieu :

L'élimination de méthyle orange par la souche identifiée E4O dans les 3 milieux a été suivi durant deux jours par spectrophotométrie, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (VI). Une meilleure dégradation a été observée dans le milieu 2 où le pourcentage de dégradation atteint le 54,05 % avec un taux de croissance de 1,3496. Suivi par les milieux 1 et 3. Malgré le résultat positif de milieu 2, une décoloration de témoin a été observée avec une diminution d'absorbance ; et par conséquent le pourcentage de

dégradation a été augmenté. Pour cette raison on a choisi le milieu 1 comme le bon milieu pour notre bactérie, et on a continué nos expériences par ce milieu.

**Tableau VI** : Effet de différents milieux de cultures sur la dégradation de MO après 2 jours d'incubation.

	M1	DO	M2	DO	M3	DO
1 J	29,03	0,1501	35,63	0,534	22,74	0,0279
2 J	45,63	0,4749	54,05	1,3496	29,56	0,25095

### III.5 Effet de la concentration initiale :

La décoloration de méthyle orange a été étudiée à diverses concentrations croissantes, varié de 10 mg/l à 50 mg/l. Les résultats obtenus ont démontrés la capacité de *A. hydrophila E4O* a toléré des concentrations faibles et élevés, Figure (6). Le taux de dégradation le plus élevé (90%) a été observé à la concentration 50 mg/l, suivi par des concentrations plus faibles de 20 mg/l (83%) et 10 mg/l (88%). Une faible dégradation a été notée avec les concentrations 30 mg/l et 40 mg/l avec un pourcentage qui ne dépasse pas 79%.

En accord avec les résultats obtenus par (Fulekar et *al.*, 2013) ; 83 % de MO a été décoloré par *A. hydrophila* à la concentration 20mg/l en 7 jours.

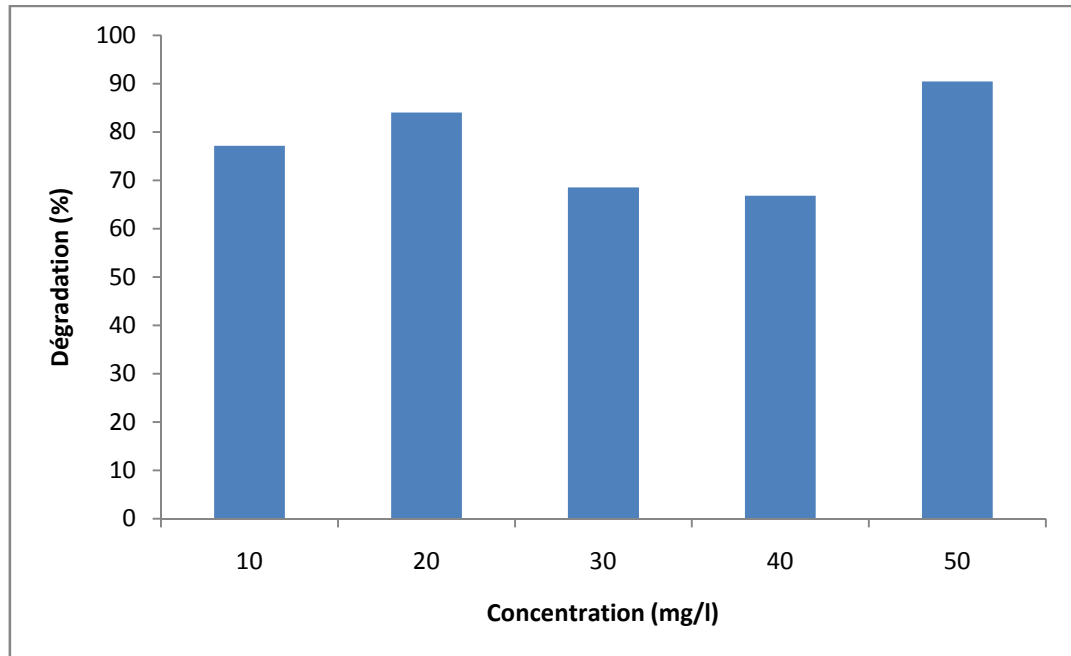
Selon Chimezie et Thomas, 2011 ; *A. hydrophila* pourrait décolorer les colorants à des concentrations plus élevées que ceux rapportés dans les eaux usées (peut varier entre 10 et 50 mg/l)

*Aeromonas sp.* pourrait décolorer plus de 95% de méthyle orange (400 mg/l) après 12 h d'incubation (Lin et *al.*, 2015).

Selon Sudip et *al.*, (2016); l'efficacité de décoloration par *Coriolus versicolor* est diminuée de 100% à 80% quand la concentration de colorant est augmentée de 100 à 500 mg/l et à 700-1200 mg/l.

Selon Saratale et *al.*, (2011) l'augmentation de la concentration du colorant diminue progressivement le taux de décoloration, probablement en raison de l'effet toxique des colorants à l'égard de l'individu bactéries ; ainsi que le blocage des sites actifs de l'azoréductase par les molécules de colorant avec des structures différentes.

Le temps de décoloration de MO par *Kocuria rosea* MTCC 1532 augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de colorant, et le taux d'élimination diminue (Parshetti et al., 2010). *Klebsiella sp. Y3* élimine plus de 96 % de MO à une concentration de 100 mg/l pendant 48h (Daizong et al., 2014).

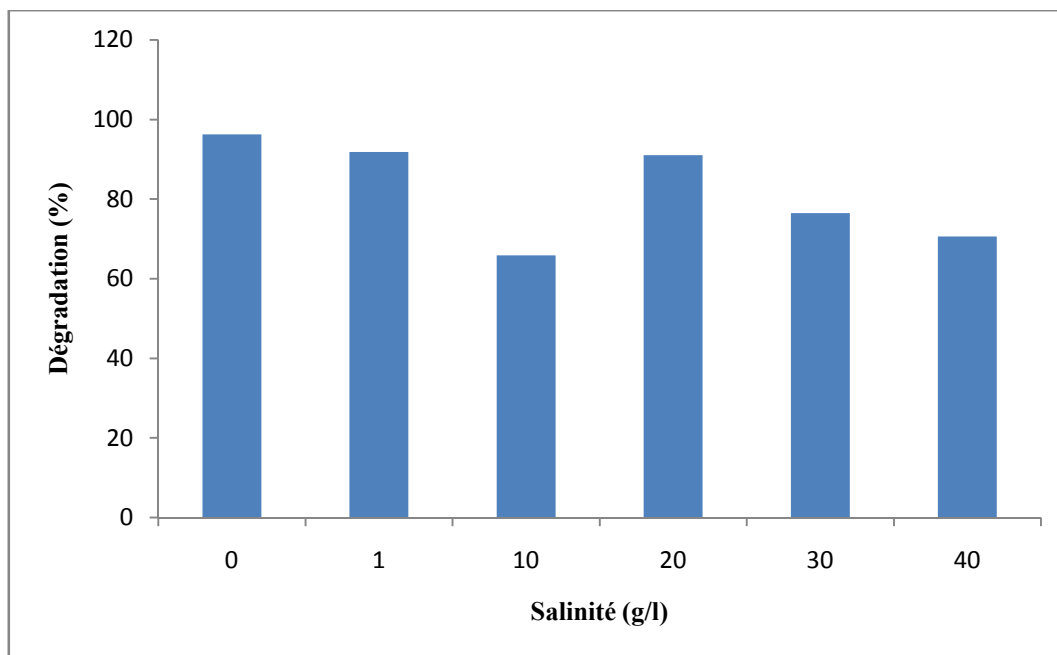


**Figure 10:** Effet de la concentration initiale sur la dégradation de MO après 7 jours d'incubation.

### III.6 Effet de la salinité du milieu :

L'effet de salinité sur la dégradation de méthyle orange est montré dans la figure (7). Les résultats montrent que la souche E4O a une forte capacité de décoloration dans une large gamme de concentration de NaCl (0-40 g / l). Le taux d'élimination a diminué à haute teneur en sel. Dans un milieu sans Na Cl on a noté une meilleure dégradation avec un pourcentage de 95% ; suivi par les concentrations 1g/l et 20g/l (91%). Une faible dégradation a été observé dans les concentrations 10g/l ; 30g/l et 40g/l avec un pourcentage qui ne dépasse pas 75%.

*Klebsiella sp. Y3* montre une décoloration de 80% de rouge de méthyle à des concentrations de sel de 1% à 4%. *Bacillus fusiformis* KMK5 dégrade l'acide orange 10 à 0,5-3 % (Daizong, 2014).



**Figure 11:** Effet de la salinité sur la dégradation de MO après 7 jours d'incubation.

### III.7 Effet du pH du milieu :

Le pH de milieu est un paramètre important qui influe sur la biodégradation des colorants. Différents valeurs de pH (de 5 à 7) ont été étudiées à 35°C ; les résultats sont présentés dans la figure (8).

Les 7 jours d'incubation ; ont révélé une décoloration au pH 5, 6, 7, 8, 9, et 10 avec un pourcentage de décoloration de 82%, 91%, 92%, 88%, 71%, 69% respectivement. La décoloration maximale (92%) a été obtenue au pH optimale de 7. Ce résultat explique que *A. hydrophila* E40 a une bon activité au pH neutre. L'étude de *Fulekar et al., (2013)* ; démontre une décoloration de 83,38% de MO par *A. hydrophila* à pH= 7.

Selon *Lin et al., (2015)* ; *Aeromonas sp.* a décoloré 100% de MO à forte pH acide (pH= 3).

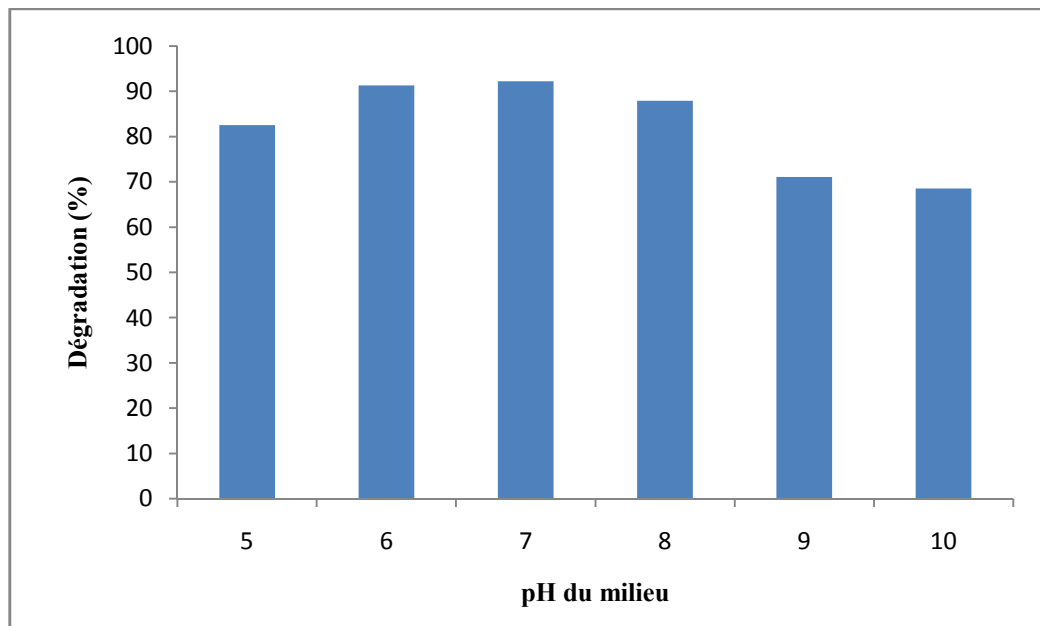
Selon *Saratale et al., (2011)* ; le pH optimal pour l'enlèvement de la couleur est souvent entre 6 et 10. Le taux d'élimination des couleurs est plus élevé au pH optimal, et a tendance à diminuer rapidement au pH fortement acide ou fortement alcalin.

Le pH du milieu est corrélé au passage de la molécule de colorant dans toute la membrane cellulaire. L'influence du pH 7 facilite le transport de la molécule de colorant à travers la membrane cellulaire, qui attribuit de plus en plus le taux de décoloration (*Sudha et al., 2018*).



Des études montrent que la décoloration de MO par *Pseudomonas luteola* était inférieure à 10 % à pH 5 (Hsueh et Chen, 2007). *Lactobacillus casei* TISTR 1500 est incapable de décolorer la MO à des valeurs de pH inférieures à 4 (Seesuriyachan et al., 2009) ; et *P. putida* mt2 ne décolorer que moins de 40% MO à pH 5 (Thao et al., 2013).

Selon Sudip et al. (2016) ; *Ganoderma sp.*(Champignon), dégrade 96,7% de MO (50mg/l) à PH 5,5 pendant 72h.



**Figure 12:** Effet de pH de milieu sur la dégradation de MO après 7 jours d'incubation.

### III.8 Effet de la température :

La température est un facteur primordial important pour tous les processus associés à la vitalité microbienne, y compris l'assainissement de l'eau (Saratale et al., 2011). Une gamme de température varie entre 30°C et 55°C a été étudiée. Les résultats de la figure (9) montrent que la température optimale de dégradation était de 35°C avec un pourcentage de 94%. L'augmentation de température au-delà de 35°C entraîne une diminution dans le taux de décoloration, où on a noté un pourcentage de 21% à 55°C. Nos résultats sont similaires à l'étude de (Chimezie et Thomas, 2011), qui montre qu'*Aeromonas hydrophila* a une activité maximale à 35°C.

Lin et al., (2014); a montré dans leur étude la capacité d' *Aeromonas sp.* a dégradé 100 mg /l de MO à 40°C.

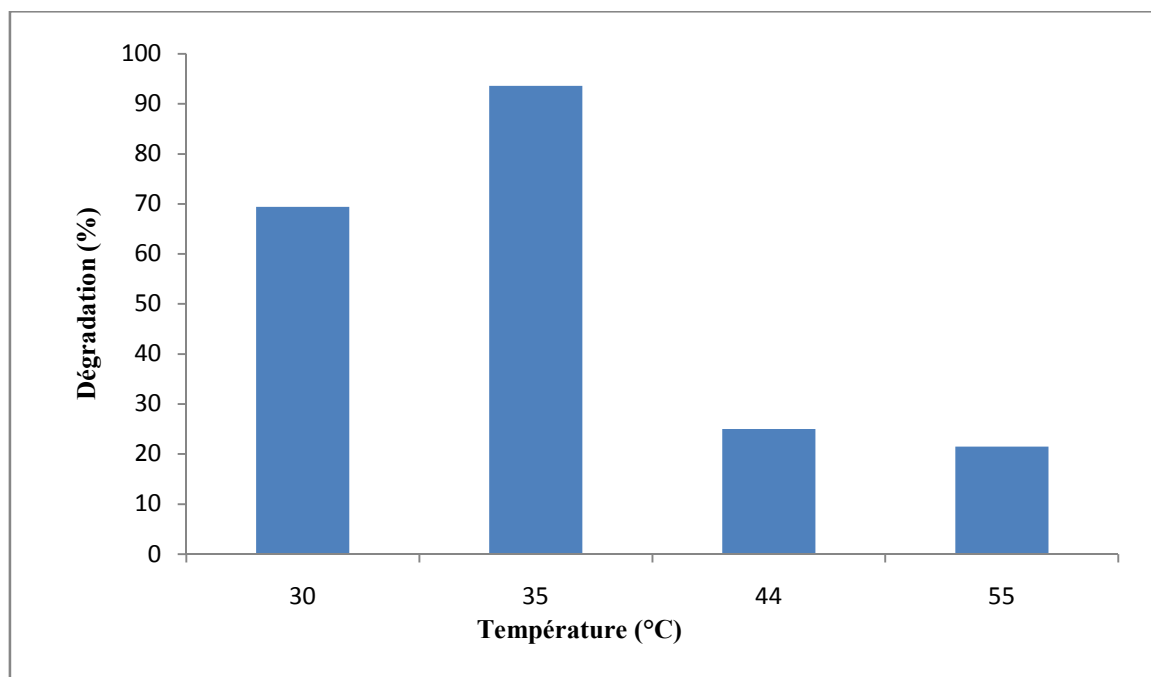
*Sphingomonas paucimobilis*, *Bacillus cereus* ATCC14579 et *Bacillus cereus* ATCC11778 décolorisent 92 % de MO à 30 °C pendant 48h (Ayed et al., 2010).

*Ganoderma sp.* ; dégrade 96,7 % de MO (50ppm), à 28°C pendant 72 h (Sudip et al., 2016).

L'étude de Parshetti et al. (2010) a montré qu'une meilleure dégradation de MO (50mg/l) par *Kocuria rosea* MTCC 1532 a été enregistrée à une température de 30 °C.

Il a été rapporté par Daizong Cui et al., 2014 que *Klebsiella sp. Y3* décolore plus de 96 % de MO (100mg/l) à 37°C pendant 48h.

Selon Saratale et al., (2011) ; la baisse de l'activité bactérienne à des températures plus élevées (> 45 ° C) peut être attribuée à la perte de viabilité cellulaire ou la dénaturation d'une enzyme azo- réductase.



**Figure 13:** Effet de la température sur la dégradation de MO après 7 jours d'incubation.

### III.9 Effet de l'agitation :

Pour l'étude de l'effet d'agitation sur la décoloration de 50 mg /l de MO par *A. hydrophila* E4O ; une incubation de 6 jours a été effectuée à 30 °C dans un incubateur agitateur de 160 tr /min. Les résultats montrés une très faible dégradation de colorant en comparant aux conditions statiques. Un pourcentage de 20,67% a été noté en agitation ; par contre 60% de décoloration a été observé après une incubation immobile.

Nos résultats étaient en désaccord avec l'étude de Saratale et *al.*, (2011) ; *A. hydrophila*, a démontré une activité efficace d'élimination des couleurs seulement lorsqu'il est incubé dans des conditions de secouement, alors qu'une décoloration pauvre a été obtenue dans des conditions statiques.

L'élimination des colorants au triarylméthane par *A. hydrophila* atteint les 90% sous l'effet d'agitation ; alors que dans l'incubation statique la décoloration ne dépasse pas le 30% (Chimezie et Thomas, 2011).

L'étude de Chang et Kuo, (2000) sur la dégradation de C.I réactif rouge par *E. coli NO3*; montre une meilleure élimination dans des conditions statique ; alors que sous l'effet d'agitation aucune décoloration a été observé.

Selon Sudip et *al.* (2016) ; *Ganoderma sp.* est capable de dégrader 96,7% de MO (50 ppm) ; à 150mg/l, pendant 72h.

La souche *Kocuria rosea MTCC 1532* a décoloré complètement (100%) le MO (50mg/l) dans des conditions statiques. Par contre il n'y avait aucune décoloration à condition de secouement. La raison de la diminution de la décoloration à l'état de secousse pourrait être la compétition de l'oxygène et les composés azoïques pour les transporteurs d'électrons réduits sous condition aérobie. La condition micro-aérobie était probablement plus favorable à la dégradation du colorant azoïque que la condition aérobie (Parshetti et *al.*, 2010).

### **III.10 Dégradation des colorants par la souche identifiée *A. hydrophila E40*:**

Pour tester l'activité d'*A. hydrophila E40* sur différents colorants ; trois colorants sont choisis : le rouge de Congo ; le vert de malachite ; et le bleu de méthylène. 1 ml de milieu LB inoculé par la bactérie a été ajouté au milieu MSM additionné de 50 mg/l de chaque colorant séparément.

Après 3 jours d'incubation à 35°C ; les résultats sont obtenus par spectrophotométrie (Tableau VII) ; révélé une très faible élimination de vert de malachite avec un pourcentage de 4,24% ; et 2,52% de bleu de méthylène. Aucune dégradation significative de rouge de Congo n'a été observée. Ces résultats confirment l'inefficacité d'*A. hydrophila E40* à dégrader ces colorants.

Des résultats différents sont obtenus d'après l'étude de Fulekar. et *al.*, 2013 ; *A. hydrophila* est capable de dégradé 86,95% ; 40,19 % de vert de malachite ; et de bleu de méthylène respectivement après 7 jours d'incubation; plus de ces colorants elle peut éliminer l'acide orange II ; et le rhodamine B ; après 3 à 7 jours d'incubation à 35°C.

*A. hydrophila* dégrade 90% ; 75% ; et 66% de base violet 14 ; base violet 3 ; et d'acide bleu 90 à 30°C pendant 24h (Chimezie et Thomas, 2011).

**Tableau VII:** Pourcentage de dégradation de différents colorants par d'*A. hydrophila E4O*.

Colorant	Bleu de méthylène	Vert de malachite	Rouge de Congo
<i>A. hydrophila E4O</i>	2,52	4,24	0

### III.11 Etude de la biodégradation du MO par le surnagent de la culture :

On a effectué une expérience, pour savoir si l'enzyme responsable de dégradation de MO est intra ou extracellulaire.

Le résultat obtenu montre que l'enzyme secrété par *A. hydrophila E4O* pour la dégradation de MO est une enzyme extracellulaire. Nous avons enregistré une décoloration du MO de 33.56 après 3 jours.

## Conclusion

Cette étude, qui s'inscrit dans le cadre général de la dépollution des eaux résiduaires industrielles, a pour objectif l'élimination des colorants synthétiques présents dans les effluents d'industriels par un traitement biologique.

Dans ce travail, à partir d'un site contaminé par un rejet industriel coloré nous avons isolées des souches microbiennes qui ont la capacité de dégrader les colorants synthétiques (colorants azoïques). Ces souches ont été isolées à partir d'un milieu MSM qui ne contient que le Méthyle orange comme source de carbone. Nous avons effectuée une variation des paramètres de culture; par l'addition d'une source de carbone supplémentaire, une source d'azote séparément et une variation de concentration de colorant. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner une souche performante. L'identification morphologique et biochimique a révélé que cette souche est *Aeromonas hydrophila* E40.

Les résultats obtenus montrent que la biodégradation est efficace pour le traitement des eaux polluées par des colorants azoïques. La dégradation des colorants azoïques en particulier le MO est effectuée par l'action des enzymes secrétées par la bactérie *Aeromonas hydrophila* E40 introduite dans le milieu à traiter ou plus de 90 % de MO a été dégradé après 7 jours d'incubation.

L'étude expérimentale, effectuée sur le Méthyle orange, a montré l'influence de chaque paramètre de culture sur le rendement d'élimination de MO par *A. hydrophila* E40.

Les conditions optimales pour la dégradation du méthyle orange par *A. hydrophila* E40 sont : 50 mg/l de MO, une température de 35 °C un pH de 7; sans agitation et une salinité qui ne dépasse pas les 30 g/l.

En perspective, il est intéressant de poursuivre l'étude en examinant d'autres aspects à savoir :

- ✓ Appliquer le traitement sur des effluents réels.
- ✓ Confirmer l'efficacité de biodégradation des bactéries sur d'autres contaminants organiques.

- ✓ L'application de la biodégradation des colorants synthétiques par d'autres microorganismes tels que les champignons et les levures et la comparaison entre les mécanismes de biodégradation de chaque microorganisme.
- ✓ Etudier la possibilité d'associations d'autres souches sur le rendement et sur l'efficacité de biodégradation.

- Ayed, L., Khelifi, E., Jannet, H. B., Miladi, H., Cheref, A., Achour, S., & Bakhrouf, A. (2010). Response surface methodology for decolorization of azo dye Methyl Orange by bacterial consortium: Produced enzymes and metabolites characterization. *Chemical Engineering Journal*, 165(1), 200-208.
- Basibuyuk M. et C.F. Forester (1997). The use of sequential anaerobic/aerobic processes for the biotreatment of a simulated dyeing wastewater. *Environ. Technol.*, 18 (1997), 843-848.
- Bauer. C., Jacques, P., et Kalt, A. (2001). Photooxidation of an azo dye induced by visible light incident on the surface of TiO<sub>2</sub>. *Journal of photochemistry and photobiology A: chemistry*, 140(1),87-92.
- Bekenniche, (2014), Caractérisation des activités de biodégradation des hydrocarbures par différents genre microbiens isolés de sites contaminés. Mémoire de Magister, Université d'Oran.
- Belhadi M. (2007) Etude de la pollution de oued Cheliff et traitement par plasma Glidarc des rejets industriels de la BCR. Thèse doctorat, université de Mostaganem.
- Ben yahia F.Z 2017 EVALUATION de la baie de Bou-Ismaïl et essai de bioremediation, Université Saad Dahleb. Blida 1.
- Brigitte MABA, Dégradation des effluents textiles (cas d'un colorant synthétique : le bleu de méthylène) par procédé Fenton en utilisant la latérite, Mémoire du Master, Institut International d'Ingénierie, Ouagadougou 01 - Burkina Faso, (2014)
- Chang, J. S., Chou, C., Lin, Y. C., Lin, P. J., Ho, J. Y., & Hu, T. L. (2001). Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Research*, 35(12), 2841-2850.
- Chang, J. S., Kuo, T. S., Chao, Y. P., Ho, J. Y., & Lin, P. J. (2000). Azo dye decolorization with a mutant *Escherichia coli* strain. *Biotechnology Letters*, 22(9), 807-812.
- Chebli Derradji, Traitement des eaux usées industrielles: Dégradation des colorants azoïques par un procédé intégré couplant un procédé d'oxydation avancée et un traitement biologique, thèse de doctorat, université Ferhat Abbas, (2012)
- Clark, R. B., Frid, C., & Attrill, M. (1989). *Marine pollution* (Vol. 4). Oxford: Clarendon Press.

- Crini, G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. *Bioresource technology*, 97(9), 1061-1085.
- Cui, D., Li, G., Zhao, M., & Han, S. (2014). Decolourization of azo dyes by a newly isolated *Klebsiella* sp. strain Y3, and effects of various factors on biodegradation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(3), 478-486.
- Dawkar, V. V., Jadhav, U. U., Ghodake, G. S., & Govindwar, S. P. (2009). Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye Navy blue 2GL by *Bacillus* sp. VUS. *Biodegradation*, 20(6), 777.
- Depa. (Danish Environmental protection Agency) (200).Denmark, Toxicity and fate of azo dyes.
- 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. *Bioresource technology*, 98(12), 2369-2385.
- Du, L. N., Li, G., Xu, F. C., Pan, X., Wen, L. N., & Wang, Y. (2014). Rapid decolorization of methyl orange by a novel *Aeromonas* sp. strain DH-6. *Water Science and Technology*, 69(10), 2004-2013.
- Du, L. N., Li, G., Zhao, Y. H., Xu, H. K., Wang, Y., Zhou, Y., & Wang, L. (2015). Efficient metabolism of the azo dye methyl orange by *Aeromonas* sp. strain DH-6: characteristics and partial mechanism. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 105, 66-72.
- Fulekar, M. H., Wadgaonkar, S. L., & Singh, A. (2013). Decolourization of dye compounds by selected bacterial strains isolated from dyestuff industrial area. *Int J Adv Res Technol*, 2(7), 182-192.
- Gernjak, W., Fuerhacker, M., Fernández-Ibañez, P., Blanco, J., & Malato, S. (2006). Solar photo-Fenton treatment—process parameters and process control. *Applied Catalysis B: Environmental*, 64(1-2), 121-130.
- Govindan, V. (2016). optimization of physical parameters for azodye degradation. *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*, 4(6).
- Guergour Saida, Elimination des polluants organiques contenus dans les eaux usées par Electro-Fenton, Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas, Setif-1, (2014)
- HAMMAMI (2008), Étude de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée. Application à la dépollution des rejets industriels, Thèse de doctorat, Université Paris-Est et Tunis El Manar.



- Hsueh, C. C., & Chen, B. Y. (2007). Comparative study on reaction selectivity of azo dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Journal of hazardous materials*, 141(3), 842-849.
- Hsueh, C. C., Chen, B. Y., & Yen, C. Y. (2009). Understanding effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of hazardous materials*, 167(1-3), 995-1001.
- Kalme, S., Jadhav, S., Jadhav, M., & Govindwar, S. (2009). Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(2), 65-71.
- Keharia, H., Patel, H., & Madamwar, D. (2004). Decolorization screening of synthetic dyes by anaerobic methanogenic sludge using a batch decolorization assay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 365-370
- Khadhraoui, M., Trabelsi, H., Ksibi, M., Bouguerra, S., & Elleuch, B. (2009). Discoloration and detoxification of a Congo red dye solution by means of ozone treatment for a possible water reuse. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2-3), 974-981.
- Kilany, M. (2017). Isolation, screening and molecular identification of novel bacterial strain removing methylene blue from water solutions. *Applied Water Science*, 7(7), 4091-4098.
- Krishnamoorthy, R., Jose, P. A., Ranjith, M., Anandham, R., Suganya, K., Prabhakaran, J., ... & Kumutha, K. (2018). Decolourisation and degradation of azo dyes by mixed fungal culture consisted of *Dichotomomyces cejpilii* MRCH 1-2 and *Phoma tropica* MRCH 1-3. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 588-595.
- 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. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 72, 94-107.
- Libra, J. A., Borchert, M., Vigelahn, L., & Storm, T. (2004). Two stage biological treatment of a diazo reactive textile dye and the fate of the dye metabolites. *Chemosphere*, 56(2), 167-180.
- Maas, R., & Chaudhari, S. (2005). Adsorption and biological decolourization of azo dye Reactive Red 2 in semicontinuous anaerobic reactors. *Process biochemistry*, 40(2), 699-705.

- Mansour, H., Boughzala, O., Barillier, D., Chekir-Ghedira, L., & Mosrati, R. (2011). Les colorants textiles sources de contamination de l'eau: CRIBLAGE de la toxicité et des méthodes de traitement. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 24(3), 209-238.
- Mesbaiah, F. Z., & Badis, A. Malachite green decolorization by marine strain isolated from Bou-Ismaïl Bay (Algeria). *Journal of Materials*, 5, 58-62.
- Nachiyar, C. V., & Rajakumar, G. S. (2004). Mechanism of navitan fast blue S5R degradation by pseudomonas aeruginosa. *Chemosphere*, 57(3), 165-169.
- O'Neill, C., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., Lourenço, N. D., Pinheiro, H. M., & Delée, W. (1999). Colour in textile effluents—sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 74(11), 1009-1018.
- Ogugbue, C. J., & Sawidis, T. (2011). Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triarylmethane dyes by Aeromonas hydrophila isolated from industrial effluent. *Biotechnology research international*, 2011.
- Palmieri, G., Cennamo, G., & Sannia, G. (2005). Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus Pleurotus ostreatus and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1), 17-24.
- Pandey, B. V., & Upadhyay, R. S. (2006). Spectroscopic characterization and identification of Pseudomonas fluorescens mediated metabolic products of Acid Yellow-9. *Microbiological research*, 161(4), 311-315.
- Pandey, B. V., & Upadhyay, R. S. (2006). Spectroscopic characterization and identification of Pseudomonas fluorescens mediated metabolic products of Acid Yellow-9. *Microbiological research*, 161(4), 311-315.
- Parshetti, G. K., Telke, A. A., Kalyani, D. C., & Govindwar, S. P. (2010). Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye methyl orange by Kocuria rosea MTCC 1532. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 503-509.
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138-157.
- Sbai, G., Oukili, K., & Loukili, M. (2016). Etude de la dégradation des colorants de textile application sur le Bleu de Méthylène [Study of the degradation of the

colouring agents of textile application on the Methylene blue]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 16(2), 272.

- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Sasaki, K., & Techapun, C. (2009). Comparative study on methyl orange removal by growing cells and washed cell suspensions of *Lactobacillus casei* TISTR 1500. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 973-979.
- Shu, H. Y., & Chang, M. C. (2005). Decolorization effects of six azo dyes by O<sub>3</sub>, UV/O<sub>3</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes. *Dyes and Pigments*, 65(1), 25-31.
- Singh, R. P., Singh, P. K., & Singh, R. L. (2014). Bacterial decolorization of textile azo dye acid orange by *Staphylococcus hominis* RMLRT03. *Toxicology international*, 21(2), 160.
- Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(1-2), 69-80.
- Sudha, M., Bakiyaraj, G., Saranya, A., Sivakumar, N., & Selvakumar, G. (2018). Prospective assessment of the *Enterobacter aerogenes* PP002 in decolorization and degradation of azo dyes DB 71 and DG 28. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 95-109.
- Sudip Kumar Sena, Smita Rautb, Partha Bandyopadhyaya, Sangeeta Rautb, (2016). Fungal decolorization and degradation of azo dye a review, *fungal biology reviews* 30 (2016), 112-133.
- Tan, N. C., Van Leeuwen, A., Van Voorthuizen, E. M., Slenders, P., Prenafeta-Boldu, F. X., Temmink, H., ... & Field, J. A. (2005). Fate and biodegradability of sulfonated aromatic amines. *Biodegradation*, 16(6), 527-537.
- Thao, T. P., Kao, H. C., Juang, R. S., & Lan, J. C. W. (2013). Kinetic characteristics of biodegradation of methyl orange by *Pseudomonas putida* mt2 in suspended and immobilized cell systems. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(5), 780-785.
- Van der Zee, F. P., & Villaverde, S. (2005). Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes a short review of bioreactor studies. *Water research*, 39(8), 1425-1440.
- Vatandoostarani, S., Lotfabad, T. B., Heidarinasab, A., & Yaghmaei, S. (2017). Degradation of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 62-72.

- Wu, F. C., Tseng, R. L., & Juang, R. S. (2001). Enhanced abilities of highly swollen chitosan beads for color removal and tyrosinase immobilization. *Journal of hazardous materials*, 81(1-2), 167-177.
- Wu, J., & Wang, T. (2001). Ozonation of aqueous azo dye in a semi-batch reactor. *Water Research*, 35(4), 1093-1099.
- Zaviska, F., Drogui, P., Mercier, G., & Blais, J. F. (2009). Procédés d'oxydation avancée dans le traitement des eaux et des effluents industriels: Application à la dégradation des polluants réfractaires. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 22(4), 535-564.

# **Annexes**

## Annexe I :

### Méthodes utilisés dans les analyses microbiologiques



**Figure 14 :** Identification morphologique de la souche E40 (Coloration de Gram)



**Figure 15:** Recherche de catalase de la souche E40



**Figure 16:** Recherche de l'oxydase de souche E40



**Figure 17:** Test de Mannitol-Mobilité de la souche E40



**Figure 18:** Recherche de l'utilisation du lactose, du saccharose, fermentation du glucose et la production d'H<sub>2</sub>S (gélose TSI) par la souche E40



**Figure 19:** Identification biochimique de la souche E40 (Galerie Api 20 E)

## Annexe II :

### Résultats des tests microbiologiques



**Figure 20** : Résultat de l'incubation de galerie API 20