



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
«BioProcédés, Hygiène & sécurité alimentaires»

**Isolement des bactéries dégradant les colorants à
partir d'un effluent de textile au laboratoire de
biotechnologie microbienne (LBM) de la FST**

Présenté par :

Idrissi Janati Boutaina

Soutenu le : 05/06/2018

Devant le jury composé de :

- **Pr.Bahafid Wifak**
- **Pr.El Farricha Omar**

Encadré par :

Pr.Bahafid Wifak

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Tout d'abord je remercie le bon Dieu tout puissant de la bonne santé, la volonté et la patience qu'il m'a donné tout au long de mes études.

Mes remerciements vont :

*Au, **Pr. IBNSOUDA KORAICHI SAAD**, Directeur du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, de m'avoir accueilli et procuré les conditions nécessaires pour mener à terme ce travail.*

*Au, **Pr. Wifak Bahafid**, mon Encadrante, pour l'aide et les conseils qu'elle m'a apporté lors des missions évoquées dans ce rapport.*

*Au, **Pr.El Farricha Omar**, de m'avoir fait l'honneur en acceptant d'évaluer ce travail et de l'enrichir par des remarques constructives.*

*Au Doctorant, **Danouche Mohammed** pour son aide qu'il m'a apporté durant mon stage.*

*Au **Pr. Lotfi AARAB** Chef de la filière Biotechnologie Hygiène et Sécurité des Aliments (BPHSA), ainsi que l'ensemble du corps professoral de la FST pour le rôle important qu'ils ont joué pour notre formation et les connaissances acquises tout au long de la durée de nos études.*

Enfin je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail.

A mes très chers Parents qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont soutenu durant tout mon parcours scolaire. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A ma chère et unique sœur.

A Mes chères tantes.

A mes chères amies Fatima Zahrae, Ghizlane, Hajar, Meryem, Hayat et Hiba.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai bien involontairement oubliés de citer.

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

Sommaire

Introduction générale	1
Présentation du lieu de stage	2
Partie 1 : Synthèse bibliographique	
1 Pollution par les effluents de textile	5
2 Colorants	5
2.1 Définition	5
2.2 Classification des colorants	5
2.2.1 Colorants naturels	5
2.2.2 Colorants synthétiques	5
2.2.2.1 Colorants azoïques	6
3 Impact des colorants sur l'environnement et la santé	7
3.1 Effet sur l'environnement	7
3.2 Effet sur la santé	8
4 Méthodes de traitement des effluents colorés	8
4.1 Méthodes physico-chimiques	8
4.2 Méthodes biologiques	10
Partie 2 : Matériel et méthodes	
1 Source d'isolement	12
1.1 Prélèvement des échantillons	12
1.2 Isolement	12
1.2.1 Enrichissement en milieu liquide	12
1.2.2 Isolement des bactéries en milieu solide	12

2 Test de décoloration	13
3 Effet de la concentration initiale du colorant	13
Partie 3 : Résultats et discussion	
1 Isolement des microorganismes	15
1.1 Résultats de l'enrichissement en milieu liquide	15
1.2 Résultats de l'isolement des bactéries	16
2 Test de décoloration	17
3 Effet de la concentration initiale du colorant RC	18
Partie 4 : Conclusion	
Conclusion	20
Références bibliographiques	21

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés du colorant azoïque (Rouge de Carmoisine).

Tableau 2 : Comparaison des procédés physico-chimiques destinés pour la dépollution des effluents textiles chargés de colorants synthétiques.

Tableau 3 : Caractéristiques macroscopiques des colonies des isolats bactériens de l'effluent.

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique des colorants azoïques.

Figure 2 : Structure chimique de la molécule d'Azorubine.

Figure 3 : Taux de décoloration du RC (50mg/L) en milieu MSM liquide contenant respectivement (RC, RC+Ext+Glu) par les bactéries de l'échantillon.

Figure 4 : Concentration des cellules microbiennes en milieux MSM liquides enrichies contenant respectivement (RC et RC+Ext+Glu) mesuré à 600nm.

Figure 5 : Taux de décoloration du RC (50mg/L) en milieux MSM enrichies après incubation à 30°C pendant 24h.

Figure 6 : Effet de la concentration initiale du RC sur la décoloration par l'isolat S₂.

Liste des abréviations

ARTAC : Association pour la recherche thérapeutique anticancéreuse

DBO : Demande Biologique en Oxygène

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DO : Densité Optique

Ext : Extrait de Levure

GC/MS: Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Glu: Glucose

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IR : Infrarouge

LBM : Laboratoire de biotechnologie microbienne

MSM : Minimal Salt Medium

RC: Rouge Carmoisine

TES : Trace Element Solution

Introduction générale

Introduction

En raison de l'industrialisation rapide, beaucoup de produits chimiques, y compris les colorants sont fabriqués et utilisés dans plusieurs domaines. Les colorants azoïques sont largement utilisés dans un certain nombre d'industries telles que la teinture des textiles, l'alimentation, les cosmétiques, l'impression sur papier et l'industrie textile (Shahid Mahmood et al, 2011). Cette dernière étant la plus grande consommatrice de ces produits.

La production mondiale de ces colorants de synthèse est évaluée à 800 000 t/an. Malheureusement, une partie de ces colorants, approximativement 140 000 t/an, sont rejetées lors des étapes de fabrication et de coloration des tissus (Ben Mansour et al, 2009).

Par conséquent, le rejet de ces effluents contaminés par les colorants a un impact négatif sur l'environnement et sur la santé humaine, ce qui nécessite un prétraitement des effluents avant leur rejet dans l'eau (M.Elkassimi et al ,1998).

Le traitement d'un tel effluent contenant un colorant a été effectué initialement en utilisant des procédés de traitement physique et chimique comprenant l'adsorption, la concentration et la transformation chimique (Satyendra Kumar Garg et Manikant Tripathi, 2017). Cependant, les méthodes physico-chimiques utilisées pour la décoloration des colorants sont moins efficaces, coûteuses et génèrent des déchets secondaires, ce qui crée un problème d'élimination (Edeline.F ,1996). Dans de telles situations, le traitement biologique peut être un réel espoir. Ces méthodes ont l'avantage d'être respectueuses de l'environnement.

En effet, des micro-organismes ont développé un système enzymatique pour la décoloration et la minéralisation des colorants azoïques dans certaines conditions environnementales (Hao et al, 2007, Pandey et al, 2007, Khalid et al, 2008). Ces méthodes ont reçu une attention croissante en raison de leur faible coût, de leur efficacité et de la faible production de boues secondaires.

Le présent travail a pour objectif l'isolement des bactéries à partir d'un effluent de textile et leur utilisation dans le traitement et la dégradation des colorants azoïques (spécialement le rouge de carmoisine) par les méthodes biologiques.

Ce rapport sera structuré en trois parties. Premièrement une étude bibliographique portant sur les colorants et leurs impacts sur l'environnement et sur la santé, ainsi que les méthodes de traitements des effluents contaminés par les colorants. La deuxième partie est consacrée pour les méthodes et les techniques analytiques utilisées. Les résultats et discussions, sont exposés dans la troisième partie.

Présentation du lieu de stage :

Dans une perspective destinée à nous familiariser avec le monde socioéconomique et de la recherche scientifique et d'essayer d'évaluer la pratique des connaissances requises durant le parcours universitaire, on est amené à réaliser un projet de fin d'études pendant une durée de 4 semaines ; ainsi j'ai eu l'opportunité d'effectuer mon stage dans le : "**Laboratoire de biotechnologie microbienne (LBM)**" de ma propre faculté, « Faculté des sciences et techniques, Fès ».

Le Laboratoire LBM a été créé en 2001. Dans le cadre de la restructuration de la recherche scientifique au Maroc. Il a été accrédité par l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah en 2005.

Le laboratoire a bénéficié de plusieurs projets et contrats financés. Ces moyens ont permis de développer une recherche appliquée de qualité qui a permis de publier plusieurs articles scientifiques dans des journaux internationaux et de soutenir plusieurs thèses de Doctorat. Le laboratoire utilise en permanence des techniques très diversifiées de l'analyse moderne : Microscopie électronique environnementale, GC/MS, HPLC, Séquenceurs d'ADN, IR et Raman. Le LBM témoigne d'une coopération internationale très large : France (Savoie, Toulouse, Paris ; Bordeaux), Espagne, Canada, Algérie, Tunisie, Turquie. Le LBM a été classé premier parmi les laboratoires de l'Université en 2014.

Le laboratoire est composé de 12 enseignants chercheurs qui forment 3 équipes de recherche :

Equipe 1 : Ingénierie des biofilms et Génie enzymatique

Thèmes de recherche :

- ◆ Isolement de microorganismes performants producteurs d'enzymes « cellulases, pectinases et lipases » et utilisation en Biotechnologie
- ◆ Isolement et lutte contre les Microorganismes impliqués dans la biodégradation du bois et du papier du patrimoine de l'ancienne médina de Fès

Equipe 2 : les agents antimicrobiens

Thèmes de recherche :

- ◆ Mise en évidence de substances à effet antimycobactérien.

Equipe 3 : Biotechnologie et Microbiologie de l'Environnement

Thèmes de recherche :

- ◆ Bioremédiation
- ◆ Associations symbiotiques entre les microorganismes et les racines des plantes.

Ce stage a été réalisé au sein de l'équipe (**Biotechnologie et Microbiologie de l'environnement**).

Synthèse bibliographique

1. Pollution par les effluents de textiles

Les effluents de textile sont parmi les effluents les plus pollués dans les différents secteurs (F.M.Drumond chequer et al ,2013).Ces effluents renferment une quantité de polluants très diversifiée et d'une grande complexité chimique : des métaux lourds, des hydrocarbures, des composés organo-halogénés, des composés tensio-actifs, et les colorants qui représentent une source importante de pollution avec une quantité de 10 à 15 % de colorants engagés se retrouvant dans les eaux usées (Bauer et al , 2001).

2. Les colorants

2.1 Définition

Les colorants sont des matières colorées, capables de se fixer sur un support. Ce sont des composés organiques qui ont la propriété d'absorber une partie du spectre lumineux dans le visible. Cette absorption est favorisée par leur structure chimique comprenant trois groupes essentiels : des groupements chromophores responsables de la couleur, des groupements auxochromes responsables de la fixation des colorants sur les substrats et la matrice (Hayet djelal et al, 2008 ; Laurent et al, 2010).

Les colorants sont largement utilisés dans plusieurs domaines : en industrie agroalimentaire, en imprimerie et en particulier en textile. Tout comme les autres additifs, les colorants sont dénommés par un E suivi d'un numéro. Ils sont ainsi répertoriés d'E100 à E180 (Martins N. et al, 2016 ; Otterstätter G., 1999).

2.2 Classification des colorants

2.2.1 Colorants naturels

Les colorants naturels sont des composés aromatiques qui peuvent être soit d'origine végétale (arbres, ou extraits de plantes) ou bien d'origine animale (extraits des insectes comme la cochenille ou des mollusques comme la pourpre).

Ils sont extraits par des procédés simples comme le chauffage ou le broyage. Il existe une dizaine de colorants naturels. Parmi ces derniers, on cite : le caramel (E150) utilisé pour les boissons, glaces ou même charcuterie, le paprika (E160C) rouge orangé qui a pour origine le poivron... (Martins N. et al, 2016). Le jaune (Curcuma) est le colorant naturel le plus répandu.

2.2.2 Colorants synthétiques

Les colorants d'origine synthétiques sont des substances qui sont obtenus par synthèse chimique à partir des molécules complexes comme le benzène (Simont. 1982).

En 1865 l'industrie des colorants synthétiques a été fondée par le chimiste anglais W.H. Perkin. Celui-ci a synthétisé la première matière colorante synthétique qu'il appela « mauvéine » (Ben Mansour et al, 2011).

Au début du 20^{ème} siècle, les colorants synthétiques ont progressivement supplanté les colorants naturels grâce à leur synthèse assez facile et à leur production rapide. En outre, la variété de leurs couleurs et leurs propriétés adaptées à leur utilisation leur a permis de dominer aujourd'hui le marché. Il existe environ 8000 colorants synthétiques chimiquement différents répertoriés dans Colour Index. Ces derniers sont classés selon leur structure chimique (H.Breuer, 2000). Parmi ces colorants, les colorants azoïques sont les plus rencontrés en industrie de textile.

2.2.2.1 Colorants azoïques

Les colorants azoïques sont des composés organiques qui sont caractérisés par la présence d'une double liaison aromatique $-N=N-$ (Donzé, 2006), unissant deux radicaux alkyles ou aryles identiques ou non (azoïques symétriques ou dissymétriques).

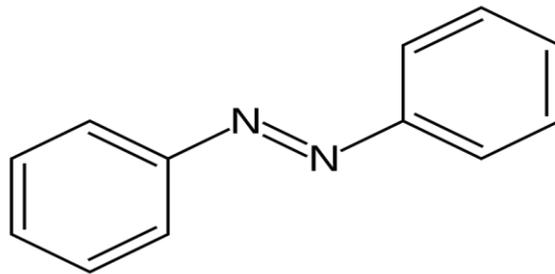


Figure 1 : Structure chimique des colorants azoïques.

Ces colorants constituent la plus large classe des colorants synthétiques qui représentent plus de 50%, soit 800 000 tonnes, de la production mondiale de la matière colorante (Bauer *et al*, 2001 ; Pandey *et al*, 2007).

Parmi ces colorants on trouve le rouge carmoisine.

L'azorubine (ou carmoisine) est un colorant alimentaire rouge qui est un dérivé azoïque utilisé pour la coloration en masse et en surface des aliments (Multon Jean-Louis, 1998).

La structure chimique de ce dernier est représentée sur la figure 2, et les caractéristiques de ce colorant sont représentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Propriétés du colorant azoïque (Rouge de Carmoisine).

Synonymes	Azorubine Acid Red 14 Rouge 14720
Nom	4-hydroxy-3-[(4-sulfonatonaphtyl) azo] naphthalène sulfonate de disodium
Dénomination	E122
Formule brute	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂
Masse Molaire (g/mol)	502.4
Couleur	Rouge foncé à brun
Point de fusion	>300°C
Caractère acide-base	pK _a =7.8
λ max (nm)	518
Hydrosolubilité	120g/l à 20°C
Utilisation	En agroalimentaire En industrie pharmaceutique En cosmétique

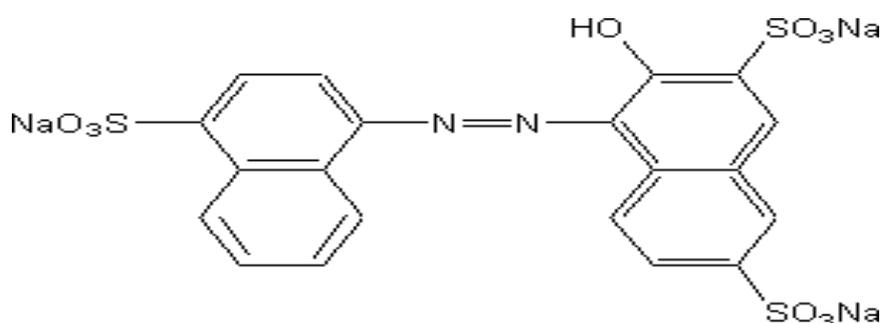


Figure 2 : Structure chimique de la molécule d'Azorubine.

3. Impact des colorants sur l'environnement et la santé

L'industrie textile rejette dans les cours d'eau, lors des divers processus de fabrication textile, une proportion importante de colorants (10 à 15 %) (Robinson *et al*, 2001 ; Papié *et al*, 2004) conduisant, ainsi, à un certain nombre de risques pour l'environnement et la santé.

3.1 Effet sur l'environnement

La présence de très petites quantités de colorants dans l'eau, affecte sérieusement la qualité et la transparence des masses d'eau telles que les lacs, les rivières et autres, ce qui entraîne des dommages pour le milieu aquatique. Ceci provoque une diminution de l'intensité de la

lumière absorbée par les plantes aquatiques et le phytoplancton, réduisant ainsi la photosynthèse et l'oxygénation des réservoirs d'eau (V.J.P. Poots et al, 1978).

En outre, la pollution par les colorants aboutie au phénomène de l'eutrophisation qui se produit lorsque les colorants libèrent des nitrates et des phosphates dans le milieu naturel, sous l'action des microorganismes (Kaushi et al, 2010). Ces ions minéraux introduits en quantité trop importante peuvent devenir toxiques pour la vie piscicole et altérer la production d'eau potable. Leur consommation par les plantes aquatiques accélère la prolifération anarchique de celles-ci et conduit à l'appauvrissement en oxygène par inhibition de la photosynthèse dans les strates les plus profondes des cours d'eau et des eaux stagnantes.

3.2 Effet sur la santé

Les colorants azoïques ont des effets toxiques, notamment cancérigènes et mutagènes, en raison de la formation des amines aromatiques (IARC, 1982). Ces derniers sont issus surtout de la décomposition de ces colorants azoïques sous l'effet de la biodégradation anaérobiques (Nilsson et al, 1993, Gonçalves et al, 1999). Ainsi, plusieurs problèmes de santé ont été rapportés à cause de la plupart des colorants azoïques, en l'occurrence le problème d'allergie cutanée et pulmonaire, des cancers cutanées et des cancers de la vessie (Sharma et Sobti, 2000).

En ce qui concerne les effets du rouge carmoisine, ce dernier est actuellement interdit aux USA, en Autriche, en Norvège, en Suède, au Canada et au Japon, vu qu'il est listé comme probablement ou certainement cancérigène par l'ARTAC (Association pour la Recherche Thérapeutique Anticancéreuse) (ARTAC,2013). Ainsi, le parlement Européen a décidé en 2010 que les produits alimentaires contenant de la carmoisine doivent mentionner sur l'étiquette « peut causer des troubles de l'attention et du comportement chez les enfants » (Union Européenne, 2012).

4. Méthodes de traitement des effluents colorés

4.1 Méthodes physico-chimiques

Plusieurs méthodes physiques et chimiques sont utilisées dans le traitement des effluents chargés en colorants tels que : la coagulation, la floculation, l'oxydation, la réduction...etc. Ces derniers sont généralement appliqués pour le traitement des composés organiques dangereux présents en faible concentration. Toutefois, Bien que les méthodes physiques, chimiques et physicochimiques soient très rapides, elles se sont avérées très coûteuses et peu efficaces compte tenu des normes exigées. En effet, ces méthodes ne sont pas toujours efficaces pour le traitement des polluants organiques persistants et les colorants dispersés (Z.Carmen et al, 2012). En outre, ils ne font que transférer une pollution sans l'éliminer (Shi et al, 2007).

Le tableau 2 résume les principaux avantages et inconvénients des techniques physico-chimiques pour le traitement des colorants cités précédemment.

Tableau 2 : Comparaison des procédés physico-chimiques destinés pour la dépollution des effluents textiles chargés de colorants synthétiques.

Techniques	Exemples	Avantages	Inconvénients
Coagulation-Floculation	Alun : $\text{Al}(\text{OH})_3$ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ FeCl_3 Polyélectrolytes	-Équipement simple. -Décoloration relativement rapide. -Réduction significative de la DCO.	-Formation de boues. -Adjonction obligatoire de produits chimiques. -Fonctionnement onéreux. -Coagulants non réutilisables. -Réduction spécifique de la couleur. -Peu d'information sur la réduction de la DBO et DCO.
Filtration sur membrane	Osmose inverse Nanofiltration Microfiltration Ultrafiltration	-Utilisation simple et rapide. -Pas d'addition de produits chimiques. -Faible consommation énergétique. -Réduction de la couleur. -Traitement de grands volumes.	-Investissement important. -Sélectif. -Encrassement rapide des membranes par colmatage. -Pré et post-traitement nécessaire.
Adsorption	Carbone actif Silice	-Réduction efficace de la couleur. -Technologie simple. -Faible coût d'utilisation pour certains adsorbants.	-Investissements et coûts de fonctionnement élevés. -Lent et limité en volume. -Régénération onéreuse des adsorbants. -Sélectif. -Formation de boues.
Oxydation chimique	Ozone Réactif de Fenton Chloration	-Traitement de gros volumes. -Diminution nette de la coloration. -Décoloration rapide et efficace des colorants solubles et insolubles. -Opération simple. -Oxydant puissant. -Décoloration rapide et efficace.	-Investissement et coûts de fonctionnement élevés. -Efficacité limitée pour certains colorants. -Sous-produits d'oxydation inconnus. -Coûts élevés. -Sous-produits d'oxydation inconnus. -Formation de sous-produits de chloration (trihalométhane cancérogènes).
Réduction chimique	Chlorure d'étain Hydrosulfite de sodium	-Décoloration rapide et efficace des azoïques.	-Formation d'amines aromatiques (toxiques). -Dégradation incomplète.

4.2 Méthodes biologiques

Les procédés d'épuration par voie biologique sont basés sur la biotransformation des polluants. En utilisant des microorganismes. En effet, la majorité des colorants sont très stables et non biodégradables. Néanmoins, beaucoup de recherches ont démontré la biodégradation partielle ou complète des colorants par voie biologique (Adosinda M et al, 2003 ; Lopez C. et al, 2004).

Plusieurs types de microorganismes sont impliqués dans ces procédés biologiques tels que les levures, les bactéries, les champignons et les algues. BROHM et FROHWEIN, 1937 ont isolé la première souche bactérienne lactique intestinale capable de réduire les colorants azoïques (Benaissa et al ,2011). Récemment, plusieurs auteurs ont rapporté la capacité de certaines bactéries à décolorer ces colorants en présence d'oxygène (K.M.Kodam et al, 2015 ; R.Khan et al, 2013 ; J.R.Aspland, 1997). Ainsi, il a été prouvé que les cellules de *Kocuria rosea* ont le potentiel de décolorer les colorants azoïques, triphénylméthane et d'autres colorants industriels tels que le vert de malachite, l'orange méthylique, le bleu réactif 25 et le bleu direct 6 (C.I.Pearce, 2003). Ces derniers sont dégradés par les bactéries grâce à certains enzymes comme l'azoéductase. Cette enzyme permet en premier lieu le clivage de la liaison azoïque et en seconde lieu l'oxydation des amines aromatiques formés.

Ainsi les avantages que présente ce genre de traitement sont résumés dans le fait qu'il est bon marché, que les coûts de fonctionnement sont bas et que les produits finaux obtenus suite à la minéralisation complète du colorant ne sont pas toxiques (Benaissa, 2011).

Matériel et méthodes

1. Source d'isolement

1.1 Prélèvement des échantillons

L'effluent de textile a été prélevé à partir d'un site pollué dans les environs de la ville de Fès.

1.2 Isolement

L'isolement des microorganismes à partir de l'échantillon prélevé a été réalisé dès la réception au laboratoire. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'isolement des bactéries. Le milieu choisi est le milieu minimum MSM (Minimal Salt Medium) dont la composition est la suivante : Na_2HPO_4 (3.5g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1g/L), KH_2PO_4 (1g/L), MgSO_4 (1g/L), FeSO_4 (0.01g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1g/L), TES (Trace Element Solution) 10mL. Celui-ci est parmi les milieux de culture utilisés pour la croissance des bactéries non exigeantes.

1.2.1 Enrichissement en milieu liquide

Dans un premier temps, nous avons procédé à l'enrichissement de la flore indigène contenue dans cet échantillon. Ceci a été réalisé en utilisant le milieu MSM liquide. L'enrichissement des microorganismes a été réalisé dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 150 ml du milieu MSM liquide. Deux essais ont été réalisés : dans le premier, le milieu est additionné du RC afin d'obtenir une concentration de 50mg/L, et dans le deuxième, le milieu est additionné de 50mg/L de RC, 1% d'Extrait de levure et 1% de glucose. Les deux milieux ont étéensemencés par 1 ml de l'échantillon. Des témoins abiotiques ont été réalisés dans les mêmes conditions.

Après incubation à 34°C sous agitation pendant 24 h en conditions aérobies, des aliquots de 1.5ml ont été prélevés et centrifugés pendant 5 min. Par la suite la détermination du pourcentage de décoloration et la concentration des cellules est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant la DO à 515nm et à 600nm respectivement.

Le pourcentage de la décoloration a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Décoloration (\%)} = ((\text{DO}_i - \text{DO}_f / \text{DO}_i)) * 100$$

DO_i et DO_f sont respectivement la densité optique initiale et finale.

1.3 Isolement et purification des isolats en milieu solide

Pour procéder à l'isolement des isolats capables de dégrader le colorant RC, nous avons utilisé le milieu MSM solide additionné de 50mg/L du RC.

L'isolement a été réalisé à partir de la suspension enrichie ayant donné la meilleure décoloration. Pour ceci, une série de dilutions (10^{-1} - 10^{-12}) a été préparée à partir de l'essai 2. En suite, 100 μl de chaque dilution ont été étalés sur des boites contenant milieu MSM solide additionné du RC. Les boites de pétri sont incubées à 30°C pendant 24h.

8 colonies d'aspects différents ont été isolées. Ces dernières ont été purifiées par repiquages successifs sur le milieu d'isolement afin d'obtenir des cultures pures.

2. Test de décoloration

Afin de sélectionner les isolats performants en terme de décoloration du RC, la capacité de décoloration des différents isolats a été évaluée par addition de 100 µL de culture microbienne à un volume de 50 ml du milieu MSM, contenant une concentration de 50 mg/L du colorant RC. Les milieux de culture ainsi inoculés ont été mis en incubation à 30°C sous agitation continue (150 rpm). Des témoins abiotiques ont été préparés et incubés dans les mêmes conditions. Le taux de décoloration du RC dans les différents milieux a été déterminé comme décrit ci-dessus.

3. Effet de la concentration initiale du colorant

L'effet de la concentration initiale du colorant sur la décoloration, par l'isolat sélectionné a été étudié. L'expérience a été menée dans des erlenmeyers contenant 50 ml du milieu MSM, additionné de différentes concentrations du RC (50mg/L, 100mg/L, 150mg/L, 200mg/L, 250mg/L et 300mg/L). Les erlenmeyers ont été inoculés par 100 µL de culture bactérienne. L'incubation est réalisée à 30 °C sous agitation (150 rpm). Des témoins abiotiques ont été préparés et incubés dans les mêmes conditions.

Résultats et Discussion

1. Isolement des microorganismes

1.1 Résultats de l'enrichissement en milieu liquide

Dans le but d'enrichir et d'isoler les microorganismes, ayant la capacité de décoloration du RC, contenus dans l'échantillon prélevé. Celui-ci a été ensemencé dans le milieu MSM additionné du RC en présence et en absence d'une source de carbone.

La figure 3 représente le taux de décoloration du RC (50mg/L) et la concentration des cellules après enrichissement en milieux MSM liquides contenant RC et RC+Ext+Glu.

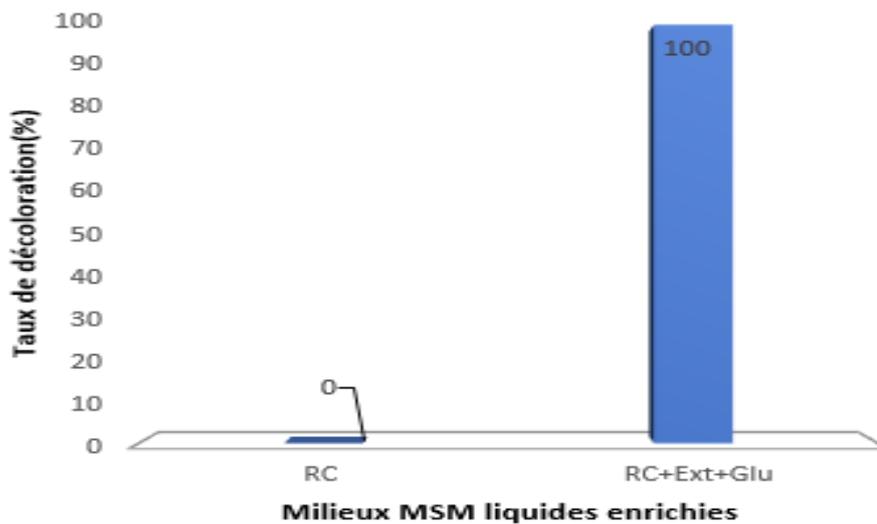


Figure 3 : Taux de décoloration du RC (50mg/L) en milieux MSM liquides enrichies contenant respectivement (RC et RC+Ext+Glu)

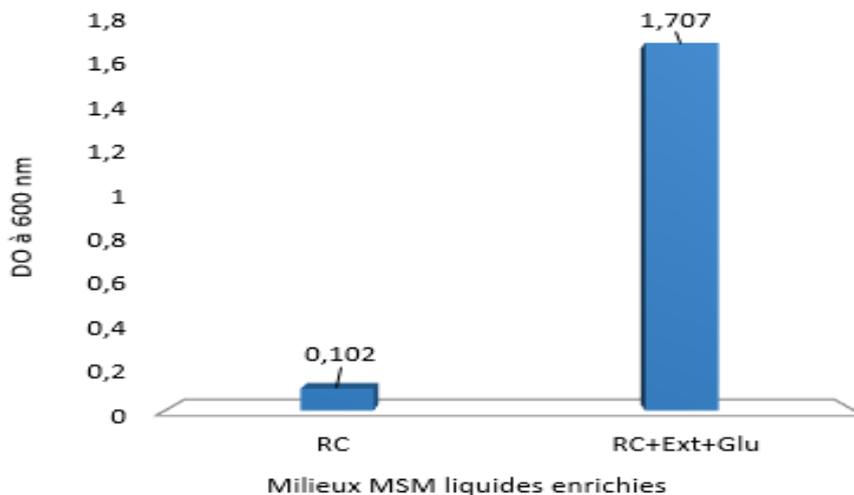


Figure 4 : Absorbance des cellules microbiennes en milieux MSM liquides enrichies contenant respectivement (RC et RC+Ext+Glu) mesuré à 600nm.

D'après les figures 3 et 4, aucune décoloration n'a été remarquée dans le milieu contenant le RC seulement. En outre une faible croissance microbienne a été enregistrée. Ceci peut être expliqué par l'absence d'une source de carbone dans ce milieu. Toutefois, le milieu d'enrichissement additionné du RC plus l'Extrait de levure et du glucose a montré un taux de décoloration de 100% et une croissance bactérienne élevée. Ceci nous permet de suggérer la présence de microorganismes résistant à l'égard du RC, et capable de croître et de décolorer le RC dans le deuxième essai contenant l'Extrait de levure et le glucose. Ces microorganismes nécessitant ainsi la présence d'une autre source de carbone autre que le RC.

Rappelons que l'échantillon est prélevé à partir d'un site pollué, ce qui marque l'adaptation des isolats à la présence des substances toxiques.

Des recherches ont démontré une amélioration du taux de décoloration en utilisant l'Extrait de levure par le consortium de *Paenibacillus polymyxa*, *Micrococcus luteus* et *Micrococcus sp* pendant la décoloration du réactif Violet 5R (Moosvi S et al, 2007).

1.2 Résultats de l'isolement des bactéries

L'observation macroscopique des isolats sur milieu gélosé nous a permis de mettre en évidence l'aspect, la couleur, la taille des colonies...etc. Ces derniers sont récapitulés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques macroscopiques des colonies des isolats bactériens de l'effluent.

Isolats	Couleur	Taille	Contour	Forme	Surface	Opacité	Hauteur
S ₁	Blanche	Grande	Régulier	Ronde	Rugueuse	Opaque	Plate
S ₂	Jaune	Petite	Régulier	Ronde	Lisse	Opaque	Bombée
S ₃	Blanche	Petite	Régulier	Ronde	Lisse	Opaque	Bombée
S ₄	Blanche	Moyenne	Irrégulier	Irrégulière	Lisse	Opaque	Bombée
S ₅	Blanche brillante	Petite	Régulier	Ronde	Lisse	Transparente	Bombée
S ₆	Blanche	Grande	Régulier	Ronde	Lisse	Opaque	Plate
S ₇	Blanche	Grande	Irrégulier	Irrégulière	Rugueuse	Opaque	Plate
S ₈	Blanche	Grande	Régulier	Ronde	Lisse	Opaque	Bombée

Sur la base des caractéristiques macroscopiques, nous avons pu révéler un nombre important de colonies sur le milieu gélosé. Ainsi, 8 isolats nommés S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 et S8 ont été isolés, purifiés et sélectionnés pour leurs capacités à éliminer le colorant RC en présentant un halo clair autour de la colonie.

2. Test de décoloration

Les 8 isolats (S1-S8) ont été testés pour évaluer leur capacité à décolorer le milieu MSM contenant 50 mg /L du RC. Ainsi afin de sélectionner l'isolat le plus performant en terme de décoloration, nous avons calculé le taux de décoloration de chaque isolat. Les taux de décoloration sont présentés dans la figure 5.

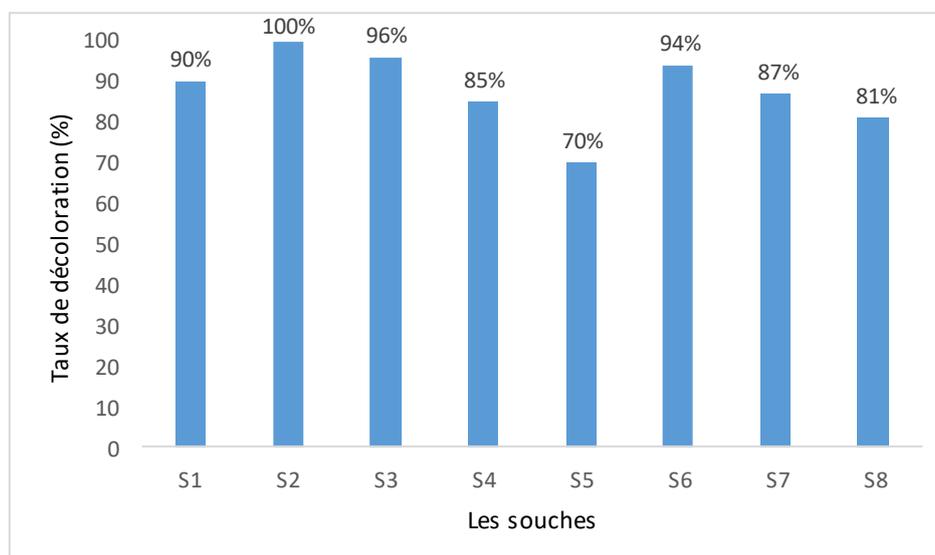


Figure 5 : Décoloration du RC (50mg/L) en milieux MSM enrichies après incubation à 30°C pendant 24h.

D'après la figure 5 représentant le taux de décoloration des différents isolats bactériens. On remarque qu'en présence de 50 mg/L du RC et après 24h d'incubation (30°C avec agitation 150 rpm), le taux de décoloration obtenu est élevé pour la plupart des isolats (70%-96%). Par ailleurs, le meilleur taux de décoloration a été observé chez la souche S2 avec un taux de décoloration de 100%.

Saranraj et al. (2010) ont étudié la décoloration et la dégradation des colorants azoïques directs à l'aide de bactéries isolées de l'effluent de colorant textile. Dans leurs recherches, *P. aeruginosa* (97,33%), *Klebsiella pneumoniae* (98,44%) et *Bacillus subtilis* (99,05%) ont été identifiées comme les meilleures souches capables d'éliminer, respectivement, le Congo Rouge, Viscose Orange – A et le Direct Green-PLS. Ces derniers, sont dégradés par les bactéries en deux étapes : un clivage de la liaison azoïque sous l'action de l'enzyme azoréductase, suivi d'une oxydation des amines aromatiques formés lors de la première étape (Hedi Ben Mansour et al, 2011).

3. Effet de la concentration initiale du colorant RC

Dans le but de déterminer l'effet de la concentration du colorant RC, la capacité de décoloration de la souche la plus performante (S2) a été testée en présence de différentes concentrations du RC allant de 50mg/l jusqu'à 300mg/l. Les résultats sont présentés sur la figure 6.

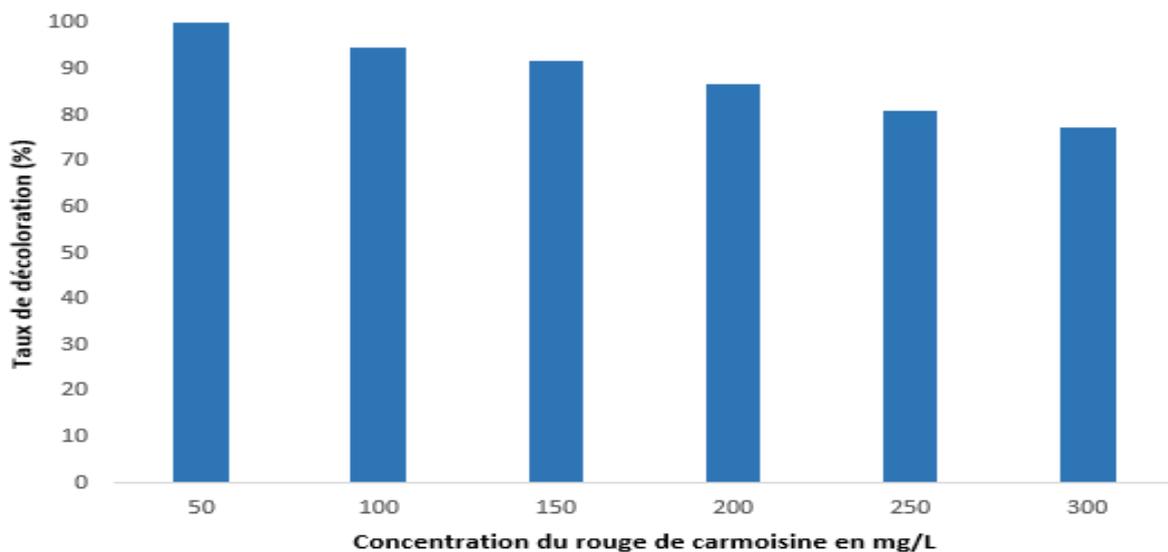


Figure 6 : Effet de la concentration initiale du RC sur la décoloration du RC par l'isolat S2.

D'après les résultats présentés dans la figure 6, on remarque que l'isolat a pu croître et décolorer de fortes concentrations en RC arrivant jusqu'à 300mg/L. Ce qui explique sa résistance vis-à-vis de ce colorant. Par ailleurs, une légère diminution dans le taux de décoloration lors de l'augmentation des concentrations de RC dans le milieu a été observée. L'isolat S2 a présenté un taux de décoloration de 91,8%, 86,8%, 80,8%, 77,4% respectivement en présence de 150 mg/L, 200 mg/L, 250mg/L et 300mg/L. Ceci peut être lié à l'effet toxique du colorant sur les micro-organismes. Cet effet toxique peut être lié aux métabolites formés lors de la réduction initiale du colorant (Whurmann et al, 1980).

L'effet de la concentration du colorant sur le taux d'élimination de la couleur par divers micro-organismes (bactéries et champignons) a été étudié par un certain nombre de chercheurs (Ogawa et al, 1986 ; Khehra et al, 2005 ; Kalme et al, 2007 ; Kalyani et al, 2009).

Khehra et al.65 et Kalme et al, ont observé que la décoloration du colorant était fortement inhibée lorsqu'une forte concentration de colorant était utilisée.

Des rapports antérieurs suggèrent que l'augmentation de la concentration de colorant diminue graduellement le taux de décoloration, probablement en raison de l'effet toxique des colorants vis-à-vis des bactéries, ainsi que le blocage des sites actifs de l'azoréductase par des molécules de colorant de structures différentes (Sani et Banerjee 1999, Tony et al, 2009).

Conclusion

Les colorants azoïques sont largement utilisés dans plusieurs domaines, tel que l'industrie de textile qui est la plus grande consommatrice de ces colorants en raison de leur facilité et de leur rentabilité en matière de synthèse par rapport aux colorants naturels. Cependant, le rejet de ces colorants dans les cours d'eaux par ces industries représente un sérieux problème pour l'environnement et la santé humaine, ce qui nécessite un prétraitement de ces effluents avant leur évacuation dans les eaux par les méthodes biologiques en raison de leur efficacité et leur faible coût.

Notre étude s'est focalisée sur l'isolement et la sélection des souches bactériennes en vue de les utiliser pour la dégradation du colorant rouge de carmoisine.

Un enrichissement a été effectué en milieux MSM liquides additionné du RC en présence et en absence de l'Extrait de levure comme source de carbone. Les résultats ont montré que le taux de décoloration ainsi que la croissance microbienne sont très élevés en présence de l'extrait de levure.

Nous avons isolés 8 isolats bactériens à partir de l'échantillon après l'enrichissement en milieu liquide. Ces derniers sont purifiés par la suite en milieu solide additionné du RC (50mg/L). Les travaux mis en œuvre dans cette étude ont montré la capacité de toutes les souches isolées à éliminer le rouge de carmoisine en présentant un halo clair autour des colonies purifiés en milieu solide.

Afin de sélectionner l'isolat le plus performant, la capacité de décoloration des différents isolats purifiés a été testée en milieu liquide additionné de 50mg/L du RC. Des taux de décolorations élevés ont été également enregistrés en milieu liquide surtout par la souche S2 qui s'est montrée performante avec un taux de décoloration de 100%.

L'effet de différentes concentrations du RC sur la capacité de décoloration de l'isolat S2 a été testé. Les résultats ont montrés que l'isolat S2 est capable d'éliminer le rouge de carmoisine sous différentes concentrations initiales de RC (50-300mg/L). Ainsi, l'augmentation de la concentration du colorant dans le milieu n'a pas fortement influencé le taux de décoloration par cette souche. Ceci montre sa résistance à l'égard du RC et sa capacité à croître et à décolorer le RC dans des milieux très pollués.

Rappelons que ces souches microbiennes ont été isolées à partir d'un site pollué, ce qui marque l'adaptation des isolats à la présence des substances toxiques, et par conséquent son utilisation dans des projets de bioremédiation.

Ce travail doit être poursuivi pour :

- * Tester les autres facteurs d'optimisations de la culture
- * Tester l'effet de la souche sur d'autres colorants
- * Utiliser dans des stations d'épurations pour traiter les effluents à grand échelle.

Références Bibliographiques

ARTAC, (2013) Association pour la Recherche Thérapeutique Anti-Cancéreuse (ARTAC) › Prévention › [Additifs](#) ; 03-2013.

Adosinda M., Martins M., Nelson L., Silvestre A. J.D., Queiroz M. J., (2003), Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes, *Chemosphere*, 52, 967–973.

Ben Mansour H., Boughzala O., Dridi D., Barillier D., Chekir-Ghedira L, Mosrati R.,(2010) « 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*, vol. 24, n° 3, 2011, p. 209-238.

Bauer C., Jacques P.,et Kalt A. (2001). Photooxidation of an azo dye induced by visible light incident on the surface of TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 140(1), 87-92.

C.I. Pearce, JR. Lloyd, JT. Guthrie, The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review, *Dyes and Pigments*, 58 (2003)179–196.

Edeline F. L'épuration physico- chimique des eaux. Editions Cebedoc, Liège, 1996.

F.M. Drumond Chequer, G.A.R. de Oliveira, E.R. Anastácio Ferraz, J.C. Cardoso, M.V.B. Zanoni, D.P. de Oliveira, *Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact*, Chapter 6. Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing, (2013)151-176

M.V.B. Zanoni, D.P. de Oliveira, *Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact*, Chapter 6. Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing, (2013)151-176

G.Simont. (1982) Guide des techniques de l'ennoblissement textile. Chapitre 11, édition industrie textile.

Gonçalves M.S.T., Oliveira-Campos A.M.F., Pinto E.M.M., Plasência P.M.S. and Queiroz M.J.R.P. (1999), Photochemical treatment of solutions of azo dyes containing TiO₂, *Chemosphere*, Vol 39, N° 5, 781-786.

Hao J.J., F.Q. Song, F. Huang, C.L. Yang, Z.J. Zhang, Y. Zheng and X.J. Tian. (2007), Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its Decolorization of azo dye. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34: 233–240.

Hayet Djelal et al. « Les effluents industriels et leur traitement », *Management & Avenir* 2008/6 (n° 20), p. 275-288.

H. Breuer, « atlas de la chimie », 2000, Librairie Générale Française.

Hu, T.L. (1998), Degradation of azo dye RP2B by *Pseudomonas luteola*. *Water Science and Technology* ,38: 299-306.

Iarc, world health organization international agency for research on cancer, monographs

on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human. "some industrial chemicals and dyestuffs", Lyon, France, (1982), vol. 29.

J.J. Donzé (2006), «Colorants textiles», Techniques de l'Ingénieur, K350, 6 pages.

J.R. Aspland, Textile dyeing and coloration, Research Triangle Park: American Association of Textile, Chemists and Colorists (1997).

Khalid, A., M. Arshad and D.E. Crowley. (2008), Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 361-369.

K.M. Kodam, Y.M. Kolekar, Bacterial Degradation of Textile Dyes, Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters, Environmental Science and Engineering, Springer International Publishing Switzerland (2015) 243-266.

Kalme S, Ghodake G, Govindwar S (2007) Red HE7B degradation using desulfonation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Int Biodeterior Biodegradation* 60:327–333.

Kalyani DC, Telke AA, Govindwar SP, Jadhav JP (2009), Biodegradation and detoxification of reactive textile dye by isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. *Water Environ Res* 81:298–307.

López C., Valade A. G., Combourieu B., Mielgo I., Bouchon B., Lema J. M., (2004). Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 335, 135–149.

M. Elkassimi, D. Meziane, S. Abouarnadasse, H. Azizi, «Elimination des colorants de l'industrie de textile par le charbon de bois». Proceeding de la 2ème conférence Maghrébine de Génie des Procédés, (1998), 555-558.

Mahmood,(2011). Isolation and screening of azo dye decolorizing bacterial isolates from dye-contaminated textile wastewater, *Soil Environ.* 30(1) : 7-12, 2011.

M.V.B. Zanoni, D.P. de Oliveira, Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact, Chapter 6. Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing, (2013)151-176.

Martins N., Roriz C. L., Morales P., Barros L., et Ferreira I. C. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 1-15.

Multon Jean-Louis, *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries Agroalimentaires*, 3ème édition, Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Edition TEC&DOC, 1998, 746 p.

Moosvi S, Kher X, Madamwar D. Isolation, characterization and decolorization of textile dyes by a mixed bacterial consortium JW-2. *Dyes Pigments* :2007;74:723–9.

Moosvi, S., H. Keharia and D. Madamwar. (2005). Decolorization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:667–672.

Nilsson R., Nordlinder, R. and Wass, U. (1993), Asthma, Rhinitis, and Dermatitis in Workers exposed to reactive dyes, *Br. J. Ind. Med.*, 50, 65-70.

Otterstätter, G. (1999). *Coloring of food, drugs, and cosmetics.* CRC Press.

Ogawa T, Yatome C, Idaka E, Kamiya H.(1986). Biodegradation of azo acid dyes by continuous cultivation of *Pseudomonas cepacia* 13NA. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*;102:12–14.

Pandey, Singh A, P. et Iyengar L. (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 59, 73-84.

Papić, S., Koprivanac, N., Božić, A.L. and Metes, A. (2004), Removal of some reactive dyes from synthetic wastewater by combined Al(III) coagulation/carbon adsorption process, *Dyes Pigments*, 62, 291-298.

Robinson T., McMullan G., Marchant R. et Nigam P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.*, 77, 247-255.

R. Khan, P. Bhawana, M.H. Fulekar. (2013), Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review, *Review of Environmental Science Biotechnology*, 12,75–97.

Satyendra Kumar Garg and Manikant Tripathi,(2017). Microbial Strategies for Discoloration and Detoxification of Azo Dyes from Textile Effluents. *Research Journal of Microbiology*, 12:1-19.

Saranraj P, Sumathi V, Reetha D, Stella D (2010). Decolourization and degradation of Direct azo dyes and Biodegradation of textile dye effluent by using bacteria isolated from textile dye effluent. *J. Ecobiotechnol.* 2(7): 7–11.

Sani RK, Banerjee UC. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme Microb Technol* 1999;24: 433– 7.

Shahid Mahmood¹, Muhammad Arshad, Azeem Khalid*, Zilli Huma Nazli and Tariq, (2011). Isolation and screening of azo dye decolorizing bacterial isolates from dye-contaminated textile wastewater, *Soil Environ.* 30(1): 7-12.

Sharma M.K. and Sobti R.C. (2000), Rec effect of certain textile dyes in *Bacillus subtilis*, *Mutat. Res.*, 65, 27-38.

Shi B., Li G., Wang D., Feng C. and Tang H. (2007), Removal of direct dyes by coagulation: The performance of reformed polymeric aluminum species, *Journal of Hazardous Materials*, 143, 567–574.

Tony BD, Goyal D, Khanna S.(2009). Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. *Int Biodeter Biodegr* ;63:462–9.

UE, (2012) Union européenne U.E. › [Règlement \(CE\) 1333/2008](#) › p.18 ; 09-2012.

V.J.P. Poots, G. Mckay, J.J. Heal, (1978). «*Removal of acid dye from effluent natural an adsorbent II*». J. Water Wood Research.10, 926-935.

Z. Carmen, S. Daniela,(2012). Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents-A Critical Overview, Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention-Environmental and Analytical Update, Edition Dr. Tomasz Puzyn, 55-87.