REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé

ETUDE DE LA BIODEGRATION DES COLORANTS PAR DES BACTERIES RHIZOSPHÈRIQUES

Présenté par

BENZERROUK MOHAMED KAMEL OULDALI YOUNES

Soutenue publiquement le 23 Juin 2022 devant le jury composé de :

Mme Salem S.	**Président**	**MAA**	**Université Y.F-Médéa**
Mme Dif S.	**Examinateur**	**MAA**	**Université Y.F-Médéa**
Mme Bouherama A.	**Encadreur**	**MCB**	**Université Y.F-Médéa**

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent, à notre encadreur ***Mme BOUHERAMA .A*** . Nous la remercions pour son encadrement, ses précieux conseils, son soutien, son oreille attentive, sa gentillesse, son dynamisme et son amitié. Merci de nous avoir fait confiance et nous a encouragé pour la réalisation de ce travail.

Nous tenons aussi à exprimer toutes notre gratitude aux membres du jury ***Mme SALEM.S ET Mme DIF.S*** pour avoir accepté d'évaluer et de juger notre travail.

Nous souhaitons remercier aussi l'ensemble des membres de laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Médéa.

Un grand merci à l'ensemble des camarades **(*Hiba,Ghada*)** du laboratoire pédagogique de « Master Microbiologie », aimable et efficace collaboration.

Merci enfin à l'ensemble des personnes qui nous ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail.

DEDICACE

*À **MES CHERS PARENTS**. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*A ma chère sœur **Hind**.*

*A ma belle promotrice **madame BOUHERAMA.A** pour son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail, pour ses orientations, sa patience et sa disponibilité.*

*A mes amis **Sidali , Zinou ,Aymen ,Rahim Adel , Sofiane, Fodhil, Tareq , Houssam , Malek** et A toutes ma famille*

A tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail,

Avec l'expression de tous mes sentiments de respect.

Mohamed Kamel

Résumé

Les colorants sont parmi les effluents industriels les plus rejetés dans l'environnement vu leur grande utilisation dans plusieurs domaines notamment le textile, cosmétique et l'agroalimentaire. Afin de limiter l'action de ses polluants organiques de façon écologique et durable, des procédés biologiques, tel que la bioremédiation, sont largement utilisés. L'objectif de notre travail est d'évaluer la dégradation des deux colorants synthétiques, à savoir le bleu de méthylène et le rouge congo par des souches bactériennes isolées du sol rhizosphérique associée aux plantules d'orge.

Les résultats obtenus ont montré qu'un grand nombre des bactéries testés (17 isolats sur 53 isolats) présente une grande capacité de biodégradation qui atteint 71 % avec le Bleu de Méthylène (Isolat B10) et 86% avec le rouge congo (Isolat E4). Plusieurs paramètres tels que le pH, la température et la concentration initiale du colorant ont été optimisés pour développer un processus de biodégradation complet. L'évaluation de la phytotoxicité a montré un effet négatif sur la germination des graines de lentilles avec le BM. L'ajout des bactéries comme inoculum a diminué voir supprimé cette toxicité, les isolats A3, A9 B4 et C1 D4 E1 E4 E5 ont donné des taux de germination de 100%.

La forte capacité de décoloration du Rouge Congo (RC) et les faibles besoins en nutriments de cette bactérie la rendent très utile dans le traitement biologique des effluents industriels contenant des colorants azoïques.

Les 17 Isolats retenus ont montré les mêmes caractéristiques phénotypiques des bactéries appartenant du genre Bacillus.

Mots-clés : Colorants synthétiques, sol rhizosphérique, Bleu Méthylène, biodégradation, Rouge de Congo.

Abstract

Dyes are the most industrial effluents rejected in the environment due to their large use in several fields, notably in textiles, cosmetics and food processing. In order to limit the action of these organic pollutants in an ecological and sustainable way, biological processes, such as bioremediation, are widely used. The objective of our work is to evaluate the degradation of two synthetic dyes, namely methylene blue and congo red by bacterial strains isolated from rhizospheric soil associated with barley seedlings.

The results obtained showed that a large number of the tested bacteria (17 isolates out of 53 isolates) present a high biodegradation capacity which reaches 71% with the methylene blue (Isolat B10) and 86% with the congo red (Isolat E4). Several parameters such as pH, temperature and initial dye concentration were optimized to develop a complete biodegradation process. Phytotoxicity evaluation showed a negative effect on lentil seed germination with BM. The addition of bacteria as inoculum had not only decreased the rate of germination but also eliminated the dyes's toxicity. 100 % of seed germination was found with isolates A3, A9, B4, C1, D4, E1, E4 and E5.

The high degradation capacity of methylene blue and the low nutrient requirements of ths bacteria consortium tested make it very useful in the biological treatment of industrial effluents containing azo dyes.

The 17 selected isolates show the same phenotypic characteristics of bacteria belonging to the genus Bacillus.

Key words: Synthetic dyes, Isolat, rhizospheric soil ,Bleu Methylene, biodegradation, Red Congo.

ملخص

تعد الأصباغ من بين النفايات الصناعية الأكثر انتشارًا في البيئة، حيث يتم استخدامها على نطاق واسع في العديد من المجالات، بما في ذلك المنسوجات ومستحضرات التجميل والأغذية. من أجل الحد من عمل ملوثاتها العضوية بطريقة إيكولوجية ومستدامة، يتم استخدام العمليات البيولوجية، مثل المعالجة الحيوية، على نطاق واسع. الهدف من عملنا هو تقييم تدهور الصبغتين الاصطناعيتين، أزرق الميثيلين وأحمر الكونغو، بواسطة سلالات بكتيرية معزولة عن التربة الجذعية المرتبطة بشتلات الشعير. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن عددًا كبيرًا من البكتيريا التي تم اختبارها (17 عزلة من أصل 53 عزلة) لديها قدرة عالية على التحلل البيولوجي تصل إلى 71٪ مع الميثيلين الأزرق (Isolat b10) و 86٪ مع الكونغو الأحمر (Isolat E4). تم تحسين العديد من المعلمات مثل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة وتركيز الصبغة الأولي لتطوير عملية تحلل بيولوجي كاملة. أظهر تقييم السمية النباتية تأثيرًا سلبيًا على إنبات بذور العدس باستخدام BM. أدت إضافة البكتيريا إلى انخفاض هذه السمية أو القضاء عليها، مما أدى إلى عزل A3 A9 B4, و C1 D4 E1 E4 E5 إلى معدلات إنبات بنسبة 100٪. إن قدرة تغير اللون العالية للميثيل الأحمر (RM) والاحتياجات الغذائية المنخفضة لهذه البكتيريا تجعلها مفيدة جدًا في المعالجة البيولوجية للنفايات الصناعية التي تحتوي على أصباغ الأزو.

أظهرت العزلات الـ 17 المختارة نفس الخصائص الظاهرية للبكتيريا التي تنتمي إلى جنس العصوية.

كلمات مفتاحية: أزرق الميثيلين ,أحمر الكونغو ,سلالات بكتيرية, العزلات, المعالجة الحيوية.

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau. I	Principaux groupements chromophores et auxochromes composant les colorants	**5**
Tableau II	Classification chimique des colorants	**6**
Tableau III	Classification tinctoriale des colorants	**8**
Tableau IV	Classification botanique de lentilles (Bouzid, 2017)	**29**
Tableau V	Les différentes solutions utilisées pour l'irrigation des graines de lentilles.	**30**
Tableau VI	Cinétique de la biodégradation du bleu de méthylène.	**40**
Tableau VII	Cinétique de la biodégradation du rouge congo.	**42**
Tableau VIII	Effet de la température sur la biodégradation des colorants.	**43**
Tableau IX	Effet de PH sur la biodégradation des colorants.	**44**
Tableau X	Concentration initiale des colorants	**45**
Tableau XI	Inoculum bactérien	**46**
Tableau XII	Aspect macroscopique des isolats testés.	**51**
Tableau XIII	Taux de croissance des isolats sous différents conditions physiologique.	**57**
Tableau XIV	Activité enzymatique des isolats testés	**61**
Tableau XV	Mise en évidence de formation de biofilm par les souches de Bacillus.sp par la méthode Rouge Congo (RCA).	**67**
Tableau XVI	Réaction des isolats avec le sulfate d'ammonium.	**69**

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Les déférentes techniques de d'oxydation avancée	**13**
Figure 2	Voie extracellulaire de dégradation des colorants par les bactéries	**17**
Figure 3	Réduction du rouge réactif 22 par *Pseudomonas luteola*	**18**
Figure 4	Localisation géographique de la wilaya d'El Menia (a) et vue satellitaire de la station de recherche expérimentale de l'université des sciences et de la technologie –USTHB-(b) et les zones de prélèvement du sol au niveau de la station (c).	**25**
Figure 5	Traits morphologiques des plantules de lentille.	**29**
Figure 6	Figure 6. Courbe d'étalonnage du bleu de méthylène (a) et du Rouge de Congo (b).	**39**
Figure 7	Taux de germination cumulé des graines de lentilles (*Lens culinaris* L.) sous irrigation avec les colorants.	**48**
Figure 8	Aspect microscopique des isolats testés.	**52**
Figure 9	Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase.	**53**
Figure 10	Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase.	**54**
Figure 11	La mise en évidence sur le milieu de culture mannitol-mobilité.	**55**
Figure 12	Mise en évidence de l'enzyme amylase.	**59**
Figure 13	Mise en évidence de l'enzyme lipase.	**63**
Figure 14	Mise en évidence de l'enzyme Uréase.	**64**
Figure 15	Mise en évidence de l'enzyme Cellulase.	**65**
Figure 16	Résultats de formation de biofilm par les souches de *Bacillus.sp* par la méthode Rouge Congo(RCA	**68**

Liste des abréviations

DBO : Demande biologique en oxygéne.

POA : les procédés d'oxydation avancée.

DCO : Demande chimique en oxygéne .

DO : la densité Optique.

Nm: Unité de longueur du Système international Nanométre.

HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique.

UV : Ultra-violet visible.

λ : La langueur d'onde.

KDP (KH2 PO4) : Dihydrogénophosphate de potassium.

Na Cl : Chlorure de sodium.

NaNO3 : Nitrate de sodium.

NH 4Cl : Le chlorure d'ammonium.

KNO 3 : Le nitrate de potassium.

MgSO4 : Sulfate de magnésium.

CaCl2 : Le chlorure de calcium.

CaCl2O2 : hypochlorite de calcium.

KCL : chlorure de potassium.

O2 : l'oxygene

GN: Gélose nutritive.

RC: Rouge Congo.

BM : Bleu de méthylène

TSA : Trypticase soy agar.

TSB : Trypticase soy bouillon.

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

Ph : Potentiel Hydrogène.

µm : Micromètre

RO : Rhizosphère Orge

Ai : Absorbance initiale à la longueur d'onde maximale du colorant.

Af : Absorbance finale après incubation à la longueur d'onde maximale du colorant.

C0 : Concentration initiale du colorant donnée en mg.L-1.

%D : Pourcentage de décoloration après un temps donné.

t : Temps d'incubation.

SAT : Test d'agglutination

VF : Viande fois

EPS : Exopolysaccharides.

TN : Témoin negative**.**

Sommaire

Remerciements .....

DEDICACE .....

Résumé .....

Liste des tableaux .....

Liste des figures .....

Liste des abréviations .....

Introduction …….

Chapitre I : Rappel bibliographique

I. Colorants 4

1. Historique 4

2. Définition 4

3. Classification 5

4. Application industrielle des colorants 9

5. Impacts des colorants 100

II. Dégradation des colorants 12

1. Méthodes chimiques 12

2. Méthodes physiques 13

3. Méthodes biologiques 14

III. Communauté bactérienne rhizosphérique 18

1. Définition et structure 18

2. Composition 19

3. Les facteurs influençant la structure de la communauté 20

4. Effet de la plante sur les bactéries rhisosphérique 23

Chapitre II. Matériel et méthode

I. Matériel 255

1. Colorants 2525

2. Bactéries rhizosphérique 255

II. Méthodes 266

1. Evaluation de la capacité de biodégradation des colorants 266

2. Influence des paramètres physico-chimique sur la cinétique de biodégradation 288

3. Evaluation de la phytotoxicité.....29

4. Caractérisation phénotypique des isolats.....311

5. Formation des spores 377

6. Formation de biofilm.....377

7. Test d'agglutination (Salting Aggregation Test_SAT).....377

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

I. Évaluation de la capacité de biodégradation des colorants par les bactéries rhizosphérique 39

1. Evaluation de la capacité de biodégradation.....39

2. Influence des paramètres physico-chimique sur la cinétique de biodégradation 422

3. Evaluation de la phytotoxicité.....466

4.Caractérisation des isolats.....49

Conclusion.....70

Références bibliographiques.....73

Annexe……..……86

Introduction

Les colorants de synthèse sont, aujourd'hui, de plus en plus utilisés dans les industries en raison de leur facilité de synthèse, de leur rapidité de production et de leur variété. 30 % des colorants utilisés dans déversée dans les eaux réceptrices sans traitement (Khadhraoui et al.,2009). Cependant, la pollution avec les colorants des eaux et sols constitue une menace à l'environnement, d'où la nécessité de traiter cette pollution par le choix et l'application d'un procédé adapté aux différentes conditions.

Les procédés de traitement de la pollution par les colorants synthétiques sont soit basés sur des méthodes physico-chimiques, soit des méthodes biologiques utilisant des microorganismes capables de dégrader les colorants visés (Singh *et al.*, 2015). En effet, la sélection de souches à haut potentiel en traitement de la pollution des eaux par les colorants s'avère indispensable, de part la diversité des colorants utilisés avoisinant les 100000, de leurs structures complexes ainsi que leurs résistances à la biodégradation (Selvam *et al.*,2003).

Les microorganismes utilisent la minéralisation comme étant le mécanisme complet de dégradation des colorants (Prasad et Aikat, 2014). Les microorganismes présentant la capacité à dégrader les colorants sont considérés comme étant la procédure la plus fiables et écofreindly pour l'assainissement des eaux usées industrielles contenant des colorants. La diversité des microorganismes et de leurs différentes voies métaboliques permet de cibler les principales catégories chimiques de colorants.

Les bactéries rhizosphériques se présentent comme des bons candidats pour l'évaluation de leur capacité de biodégradation des colorants. Ces bactéries possèdent des qualités d'adaptation aux différents substrats de pouvoir les utiliser comme des substrats de carbone et d'énergie grâce à l'arsenal enzymatique qu'elles possèdent.

Le présent travail s'intègre dans le cadre de développement des procédés biologiques de traitement de la pollution des eaux usées par la recherche et la sélection de nouvelles souches à haut potentiel épuratoire et une meilleure adaptation aux variations de la composition de l'effluent à traiter, qui sont les principaux problèmes rencontrés dans les stations de traitement.

Notre travail consiste à tester la capacité d'une communauté bactérienne associées à la rhizosphère de l'orge (*Hordeum vulgare*.L) a biodégrader deux colorants très utilisés dans les industries, à savoir le bleu de methylène et le rouge Congo. Pour cela un ensemble d'objectifs a été planifié :

- ✓ Etude de taux de biodégradation de la communauté bactérienne retenue pour le bleu de méthylène et rouge congo.
- ✓ Evaluation de la cinétique de biodégradation des colorants par la communauté bactérienne.
- ✓ Evaluation de l'effet des différents paramètres sur le taux de biodégradation des colorants
- ✓ Caractérisation phénotypique, biochimique et physiologique des bactéries a fort pouvoir de biodégradation.
- ✓ Etude de la phytotoxicité des colorants et impact des bactéries dans la réduction de la toxicité.

Chapitre I : Rappels bibliographiques

I. Colorants

1. Historique

Les premiers colorants connus sont des colorants naturels (pigments minéraux) qui datent du paléothique (vers 15.000 av JC). Et qui ont été utilisé dans les grottes de Lascaux. Vers 1500 av JC, les Egyptiens utilisaient comme colorants du safran, du pastel et de la garance. Jusqu'en 1850, tous les colorants utilisés dans l'alimentation étaient naturels (chlorophylle pour le vert, charbon pour le noir ...etc.).

En 1856, le chimiste, William Henry Perkin (1838-1907) essaya de synthétiser la quinine ($C_{2O}H_{24}O_2$), pour combattre le paludisme qui touchait les troupes anglaises stationnées en Inde. Ses essais l'amenèrent à oxyder un dérivé de l'aniline qui est l'allyltoluidine ($C_{10}H_{13}N$) et il a obtient un précipité brun. Ce précipité qui a été nommé par la suite le pourpre d'aniline ou mauvéine, est le premier colorant synthétique utilisable par l'industrie.

2. Définition

Un colorant proprement dit est une substance naturelle ou synthétique qui possède deux propriétés spécifiques et indépendantes l'une de l'autre, la couleur et l'aptitude à être fixée durablement sur un support (Pujol,2005 ; De Reguardati et Barthe ; 2012). Ce support peut être les textiles, les encres, les peintures, les vernis, les produits alimentaires, … .

La terminologie industrielle moderne définit un colorant comme un produit contenant un colorant organique pur avec différents additifs et agents de coupage, qui facilitent son utilisation (Bahloul,2007). Les propriétés colorantes des composés organiques dépendent principalement sur leur structure. En général, les produits utilisés comme colorant sont des composés organiques insaturés et aromatiques (Karl, 1981), et qui comportant dans leurs molécules trois groupes essentiels : le chromophore, l'auxochrome et la matrice (Tab.I).

Le site actif du colorant est le chromophore, il peut se résumer à la localisation spatiale des atomes absorbant l'énergie lumineuse. (Laurent et al., 2010)

Tableau I. Principaux groupements chromophores et auxochromes composant les colorants (Ben mansour et al., 2011)

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

3. Classification

Contrairement à l'usage établi en chimie organique, la terminologie employée dans le domaine des colorants n'obéit à aucune règle absolue. Une classification rationnelle des matières colorantes organiques présente de grandes difficultés.

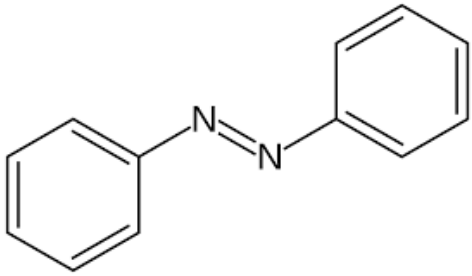
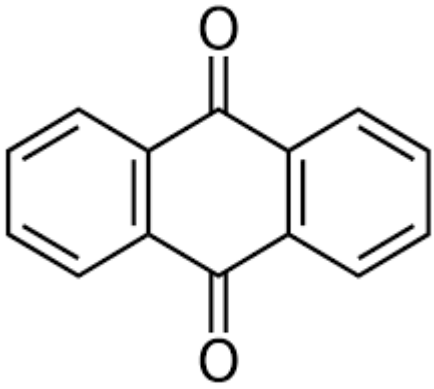
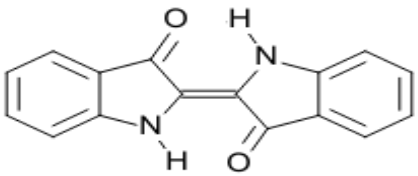
3.1. Selon leur origine

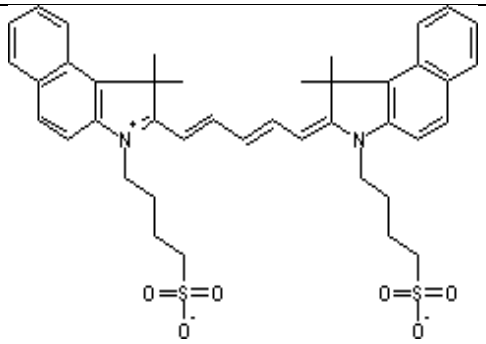
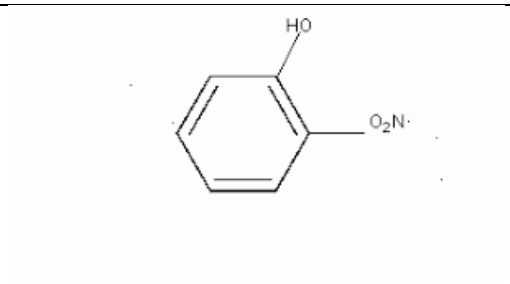
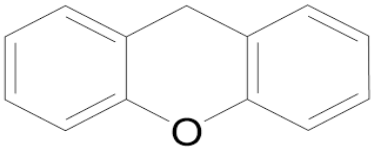
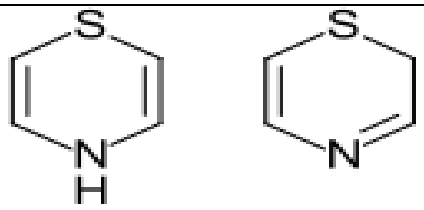
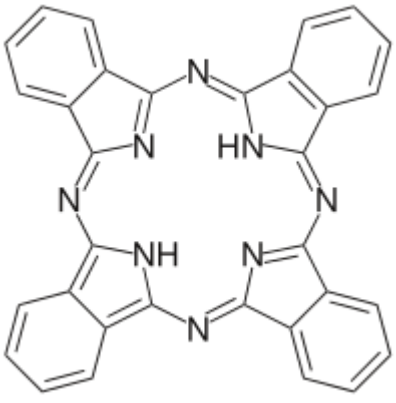
Les colorants sont classés en fonction de leurs origines (Lemonnier, 2002) à des colorants naturelle, qui peuvent être végétale (indigo, garance, roucon, safran, orseille, cachou, curcuma, naprum, pastel, noix de galle, gaude,…), animale (cochenille, kernès, pourpre, …) ou minérale (oxyde de fer, bleu de prusse, graphite, …) et à des colorants synthétiques. Ce sont les colorants les plus utilisés dans les industries de coloration et des textiles grâce à leur synthèse assez facile, à leur production rapide et à la variété de leurs couleurs comparées aux colorants naturels (Griffiths,1984).

3.2. Selon la structure chimique

Les colorants synthétiques sont classés selon leur structure chimique à deux groupes majeurs : Les colorants azoïques et les colorants non azoïques. Cette classification se repose sur la nature du groupe chromophore (Tab.II).

Tableau II. Classification chimique des colorants (Naitmerzougui,2014) .

Colorants	Caractéristiques et propriétésgénérales	Structure
Azoïques	- Présence du groupefonctionnel AZO (–N=N–) qui peutêtrerépétéplusieursfoisdans la molécule pour former les diazoïques, trisazoïques,etc…; - Toxiques, cancérogènes - Constituent 50 % de la production mondiale descolorants Se répartissenten colorants acides, basiques, directs et réactifssolublesdansl'eau…etc.	
Anthraquinoniques	- Les plus importants après les colorantsazoïques - Formegénéraledérivée del'anthracène - Leur chromophore est un noyauquinonique sur lequelpeuvents'attacher des groupeshydroxylesouamino - Couvrenttoute la gamme de nuancesjaune-orange-rouge Solidité à la lumière et vivacité des coloris surtout dans le bleu et leturquoise	
Indigoïdes	- Formegénéraledérivée del'indigo - Résistance remarquable aux traitements delavage	

Polyméthiniques	- Présence de groupementshétérocycliquesdonneurs et accepteursd'électrons aux extrémitésd'unechaînepolyméthiniques - Faiblerésistanceàlalumièreetbonssensibilisateursphotographiques (particulièrement les cyanines).	
Nitrés et nitrosés	- Présence d'un groupe nitro (─NO2) en position ortho par rapport à un groupementélectrodonneur (hydroxyleougroupesaminés) - Structuresimple, trèslimité ennombreetrelativementpascher.	
Xanthènes	- Intense fluorescence Marqueurs lors d'accident maritime ou traceurs d'écoulement pour des rivièresouterraines.	
Thiazines	-Présence d'un anneau de quatre carbones, un azote et unatome de soufre	
Phtalocyanines	- Structure complexebasée sur l'atome central de cuivre - Employésdansl'industrie de pigments pour peinture et dans la teinture des fibrestextiles	

3.3. Selon la classification tinctoriale

La classification tinctorialese (Tab.III) repose sur la méthodes d'application des colorants sur les différents substrats (textiles, papier, cuir, matières plastiques,...) (Ben mansour et al ., 2011)

Tableau III. Classification tinctoriale des colorants (Ben mansour et al ., 2011)

Colorants	**Caractéristiques et proprieties générales**
Directs	- Capables de former des charges positives ounégativesélectrostatiquementattirées par les charges des fibres. - Affinité élevée pourles fibres cellulosiques sans application de mordant (teindredirectement le coton). - Prix modéré, facilité d'application et faibles oliditéaux traitements de lavage.
Colorants de cuve	- Insolubles dans l'eau - Utilisés pour l'application de l'indigo qui nécessite la préparation d'une cuve de bonne résistance aux agents de dégradation
Réactifs	- Présence de groupes chromophores issues essentiellement des familles azoïques, anthraquinoniques et phtalocyanines. - Présence d'une fonction chimique réactive de type triaziniqueouvinylsulfone assurant la formation d'une liaison covalente forte avec lesfibres. - Solublesdansl'eau.
Colorants à mordant	-Présence d'un ligand fonctionnel capable de réagirfortement avec un seld'aluminium, de chrome, de cobalt, de cuivre, de nickel ou de fer pour donner différents complexes colorés avec le textile
Basiquesoucationiques	- Solublesdansl'eau (car ilssont des selsd'aminesorganiques). - Forment des liaisons entre leurs sites cationiques et les sites anioniques desfibres. - Faible résistance à lalumière.
Acides ou anioniques	- Solublesdansl'eaugrâce à leursgroupes sulfonates ou carboxylates. - Affinitéélevée aux fibrestextiles. - Permettent de teindre les fibresanimales (laine et soie) et quelquesfibresacryliquesmodifiées (nylon,polyamide).

Dispersés	- Trèspeusolublesdansl'eau - Application sous formed'une fine poudredisperséedans le bain deteinture.

4. Application industrielle des colorants

L'industrie des colorants constitue un marché économique considérable car de nombreux produits industriels peuvent être colorés, principalement :

4.1. Industrie agro-alimentaire

Les colorants alimentaires, également dénommés additifs de couleur, confèrent une coloration aux aliments, renforcent celle-ci ou compensent la perte de couleur provoquée par une exposition à la lumière intense, à la chaleur excessive et aux variations de température. Ajoutés à la nourriture ou à boisson, ils normalisent la teinte et préviennent la décoloration. Les colorants sont employés dans un but esthétique pour rendre les aliments appétissants et attractifs aux yeux des consommateurs.

4.2. Industrie pharmaceutique

Dans le domaine pharmaceutique, l'ajout de colorants à la formulation d'un médicament a pour but de permettre aux patients qui utilisent plusieurs produits, en particulier ceux qui ont des difficultés pour lire, de reconnaître et de différencier plus aisément les médicaments prescrits. Aussi, servir comme code marketing et potentiellement, augmenter l'efficacité du médicament à travers un effet placebo. Par exemple les colorants jaunes ou oranges sont associés le plus souvent aux fortifiants, les teintes pastels aux sédatifs, le bleu à un effet relaxant, et le rouge aux effets stimulants.

D'un autre côté les colorants sont un moyen pour juger la bonne conservation d'un médicament, car un changement de coloration au cours du stockage peut généralement attester d'une possible altération du principe actif.

4.3. Industrie des textiles

Un colorant doit posséder, outre sa couleur propre, la propriété de teindre, cette propriété résultant d'une affinité particulière entre le colorant et la fibre est à l'origine des principales difficultés rencontrées lors des traitements. En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants synthétiques doivent répondre à un certain

nombre de critères afin de prolonger la durée de vie des produits textiles sur les quels ils ont appliqués : résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment les détergents) et aux attaques microbiennes. L'affinité du colorant pour la fibre est particulièrement développée pour les colorants qui possèdent un caractère acide ou basique accentué, ces caractéristiques propres aux colorants organiques accroissent leur persistance dans l'environnement et les rendent peu disposés à la biodégradation (Pagga et Brown ;1986).

4.4. Biotechnologies

Les colorants ayant plusieurs utilisations biologiques et applications biotechnologique ; dans le tableau suivant nous avons cité l'utilisation biologique et biotechnologique de bleu de méthylène et de rouge neutre.

colorants / Utilisation	Blue de méthylène	Rouge neutre
Applications en biologie	**Sang; moelle osseuse; œil lentille; ganglions sentinelles; tissus mammaires; nucléique acides.**	**Cellules; lysosomes; noyaux; acides nucléiques; rétine**
Applicationsen biotechnologie	**Détection de microorganismes; traitement de la rétinopathie diabétique, dégénérescence maculaire, mélanomes malins de l'UV, érysipèles, hidradénites suppurativa,**	**Détection de pathogènes, les infections bactériens; traitement de la dégénérescence musculaire liée à l'âge, brûlures, cancer, diabète, obésité, infections par les champignons, maladies virales**

5. Impacts des colorants

5.1. Pollution

Les colorants rejetés présentent un problème environnemental majeur. La couleur est le premier contaminant des eaux usées à être reconnu, car une très petite quantité de colorant azoïque dans l'eau (<1ppm) est très visible.

Cela affecte la transparence et la solubilité eau-gaz. La perte de la transparence de l'eau diminue la photosynthèse, générant une carence en O_2 et la régulation des cycles biologiques du biotope aquatique est atteinte (Arun et al.,2017).

De nombreux colorants azoïques sont aussi très toxiques pour l'écosystème et présentent un risque mutagène. Ils peuvent avoir des effets sur les organismes (aigus à chroniques), en fonction de la concentration en colorant azoïque et du temps d'exposition (Harshad et al.,2015). D'un point de vue sanitaire, l'ingestion de ces colorants produit des lésions neurosensorielles ainsi que des stress métaboliques importants sur les organismes entrainant la mort chez les poissons. Chez les plantes, ils aboutissent à une réduction importante de la productivité.

5.2. Toxicité

La toxicité (mortalité, effet mutagénique et cancérigène) des différents types de colorants synthétique 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.

Des études faites sur divers colorants commerciaux ont démontré que les colorants basiques (bleu Capri ,bleu Méthyléne ,Le violet de gentiane) sont les plus toxiques pour les algues (Greene et Baughman ; 1996).

Ce résultat a été prouvé par le test de mortalité des poissons effectués sur 3000 colorants commerciaux où il s'est avéré que les colorants basiques, et plus particulièrement ceux de la famille de triphénylméthane sont les plus toxiques. Par ailleurs, les poissons semblent être relativement sensibles aux colorants acides (Clarke et Anliker ;1980).

D'autre part, la mortalité examinée avec des rats a montré que seulement 1% sur 4461 colorants commerciaux présentent des valeurs de DL50 au-dessous du poids corporel de 250 mg kg^{-1}. Par conséquent, la chance de la mortalité humaine due à la toxicité aiguë de colorant est probablement très basse.

Cependant, il a été prouvé que quelques colorants dispersés peuvent causer des réactions allergiques, dermatologiques, etc (Specht et Platzek ; 1995). Par ailleurs, l'effet d'exposition des ouvriers dans l'industrie de textile aux colorants a suscité l'attention. Par conséquent, il s'est avéré que 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.

II. Dégradation des colorants

La mise en place d'une procédure de dégradation des colorants dans les lieux de rejets nécessite la prise en considération de leur hétérogénéité de composition. L'efficacité de cette procédure implique une application d'une chaîne de traitement assurant l'élimination des différents polluants par étapes successives. La première étape consiste à éliminer la pollution insoluble par l'intermédiaire des traitements physiques ou physico-chimiques assurant une séparation solide/liquide.

1. Méthodes chimiques

Les techniques d'oxydation sont les plus utilisées pour le traitement des composés organiques en faibles concentrations (Eckenfelder , 1992)

Les procédés classiques d'oxydation sont fondés sur l'addition d'un agent oxydant dans la solution à traiter, dont les plus utilisées sont : Cl_2, O_2, H_2O_2, O_3 (Ben Mansour et *al*., 2011 ; Maba,2014)

Les procédés d'oxydation avancée (POA) (Fig.3) sont basés sur la génération d`une entité radicalaire très réactive et très oxydante, les radicaux hydroxyles •OH (Hammami, 2008 ; Zaviska,2009).

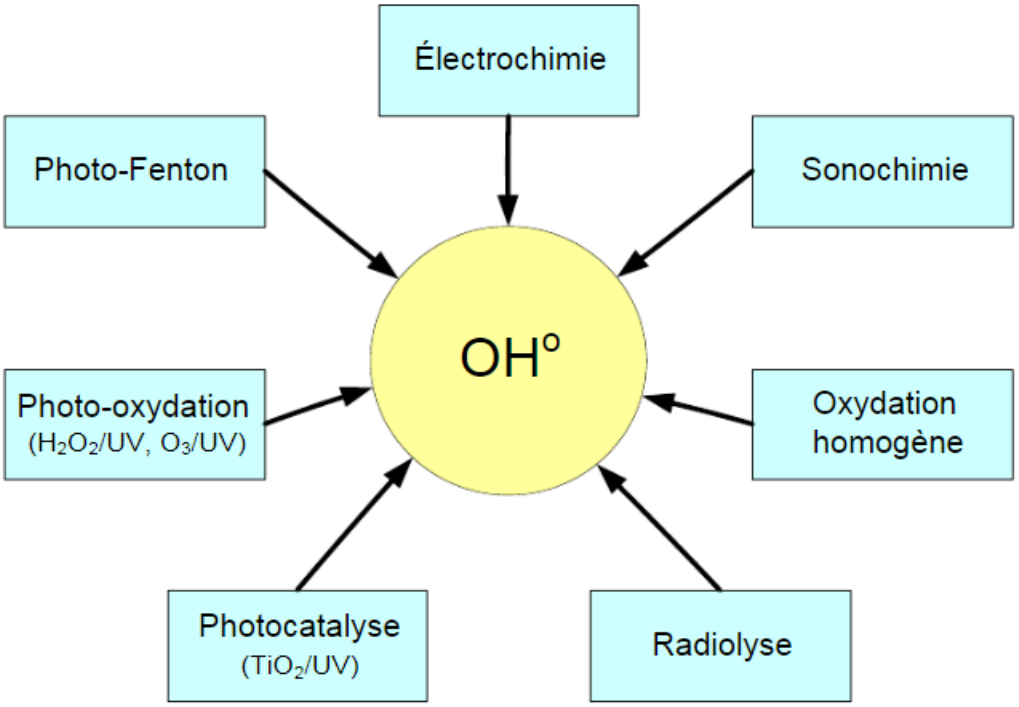


Figure 1. Les déférentes techniques de d'oxydation avancée (Zaviska et al.,2009)

2. Méthodes physiques

Il existe trois approches et techniques physique utilisés pour la dégradation des colorants :

2.1. Filtration sur membrane

Ce procédé est utilisé pour la dépollution, au cours de laquelle les polluants sont retenus en amont d'une membrane semi perméable dont le diamètre des pores est inférieur à celui des molécules à éliminer pour produire un perméat purifié en aval, et un concentré qui reçoit les impuretés organiques en amont. Selon l'effluent désiré, et selon la taille des impuretés on constate la microfiltration, l'ultrafiltration ou la nanofiltration ou encore l'osmose inverse. Parmi les quatre types de procédés, la nanofiltration et l'osmose inverse sont les plus adaptés à la réduction partielle de la couleur et des petites molécules organiques, mais l'osmose inverse reste la plus répandue (Taylor et Jacobs, 1996).

2.2. Adsorption

C’est un phénomène physico-chimique qui permet le transfert de la matière entre une phase liquide (ou gazeuse) chargée en composés organiques ou inorganiques et une phase solide. L’adsorption sur le charbon actif ou d'autres matériaux adsorbants peut être utilisé pour éliminer plusieurs colorants des effluents textiles, mais reste très limitée pour l’élimination de tous les colorants. Seuls les cationiques, les colorants à mordant, dispersés ou dits de cuve et réactifs sont éliminés par cette technique (Raghavacharya, 1997).

2.3. Coagulation – floculation

La coagulation-floculation est souvent appliquée pour le traitement des eaux usées de l'industrie de textile pour réduire la demande chimique en oxygène (DCO) et la couleur avant le traitement biologique. Elle peut aussi être utilisée comme procédé principal de traitement (Mckay et al., 1987). Ce procédé est basé sur l'addition d'un coagulant qui permet de déstabiliser les fines particules colloïdales ou des solides fins en suspension et facilite leur agglomération en formant des flocs. Par la suite, un floculant est ajouté pour permettre aux agrégats déjà formés par le coagulant de s’élargir et d’entrer en contact plus facilement et donc d’accroître le taux de captage des flocs lors du traitement par filtration (Colinlafleur, 2008). Des coagulants inorganiques tels que l'alun donnent des résultats satisfaisants pour la décoloration des effluents textiles contenant des colorants dispersés, de cuve et au soufre, mais sont inefficaces pour les colorants réactifs, azoïques, acides et basiques (Barclay et Buckley , 2000 ; Vendevivre et al., 1998).

3. Méthodes biologiques

Le traitement biologique implique la biodégradation qui est un processus qui se base essentiellement sur l’utilisation des microorganismes et plus particulièrement les bactéries (Xinying et *al*., 2017).

La biodégradation est l’ensemble des mécanismes de transformation d’un contaminant en différents sous-produits par l’action des microorganismes (bactéries ; champignons ; levures …) (Sudha et *al*., 2018). 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 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).

3.1. 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 éliminent les complexes organiques soit par adsorption ou par dégradation partielle ou complète (minéralisation). Cette dégradation se fait par la production d'enzymes ligninolityques extracellulaires comme la laccase, manganèse peroxydase, la lignine peroxydase, et l`azoréductase. (Govindan et *a*l., 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).

Les espèces qui sont capable de dégrader les colorants azoïques sont : Phanerochaetechrysosporium, Coriolusversicolar, Trametesversicolar, Fungaliatrogii, Penicillium geastrivous, Rhizopusoryzar, Pleurotusostreatus, Rigidoporuslignosus, Pycnoporussanguineus Aspergillus flavus, et Aspergillus niger, (Govindan et al., 2016).

3.2. Biodégradation par les levures

La cultivation et la manipulation des levures est très difficile. Leurs activités sur les colorants est très faible, et dépond une longue durée (Ben Mansour et *al*., 2011). Seule *Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763* qui a montré une capacité de cliver la bonde azoïque de méthyle rouge, et le dégrader totalement dans 12 heures (Simin et *al*., 2017).

3.3. 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).

3.4. 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).

3.5. Biodégradation par les bactéries

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).

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

Les bactéries dégradent les colorants par une minéralisation. La minéralisation des colorants azoïques se fait en deux étapes successives, après que le colorant sera transformé à l'intérieur de la cellule bactérienne -voie intracellulaire- (Fig.2) (Ben Mansour et *al*., 2011).

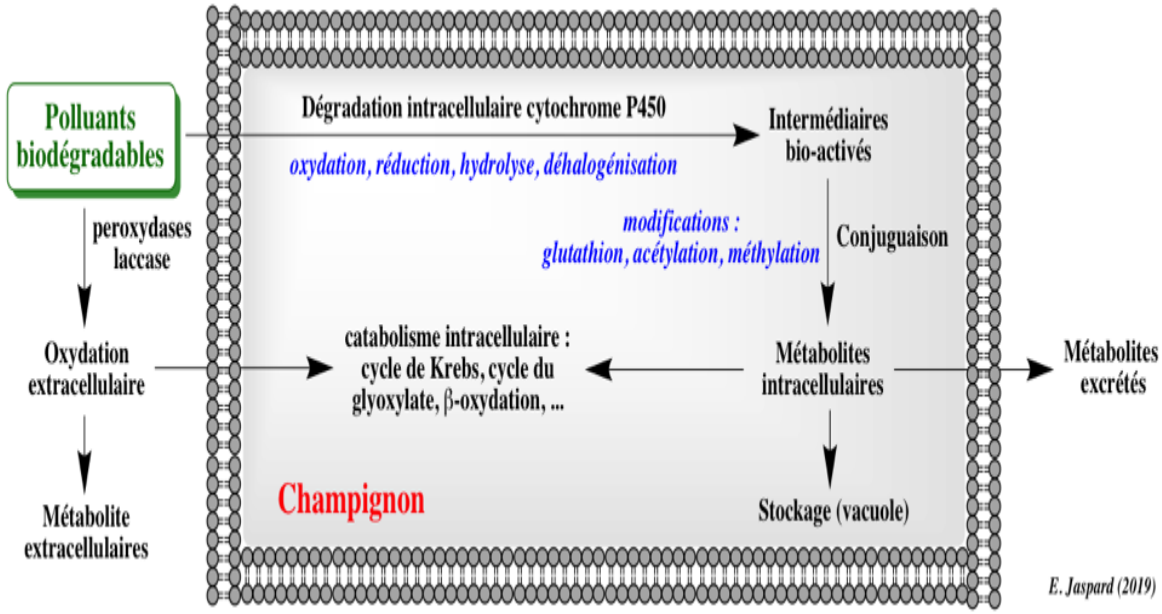


Figure 2. Voie extracellulaire de dégradation des colorants par les bactéries (Jaspard ,2009)

Malgré la présence de l'oxygène, la dégradation initiale des colorants semble être une réduction de la liaison azoïque –NQN- 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)

$$\mathbf{R1{-}N{=}N{-}R2 + 2\,e^{-} + 2\,H^{+} \text{ ==== > } R1{-}NH{-}NH{-}R2}$$

$$\mathbf{R1{-}NH{-}NH{-}R2 + 2\,e^{-} + 2\,H^{+} \text{ ==== > } R1{-}NH2 + R2{-}NH2}$$

(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).

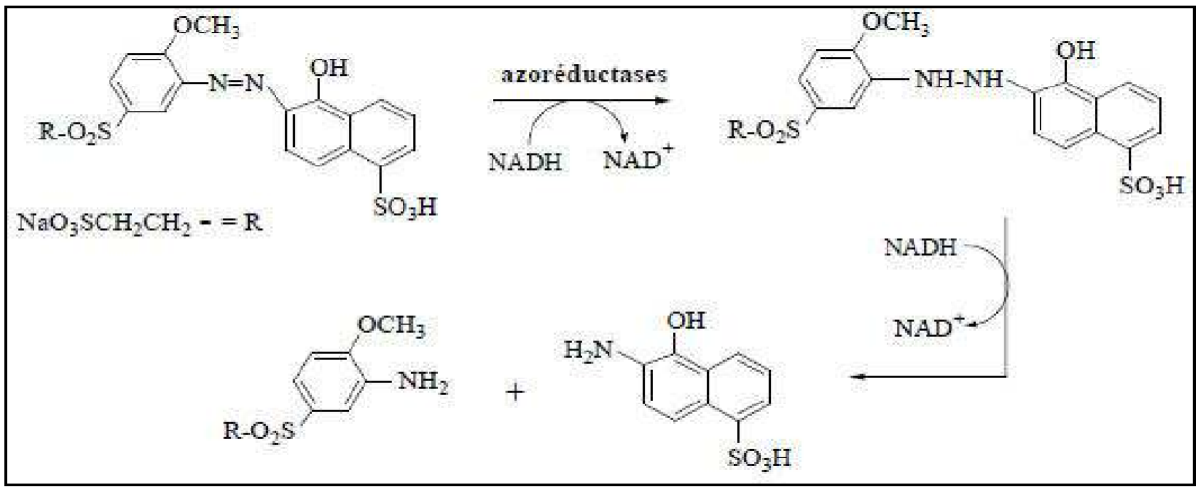


Figure 3. Réduction du rouge réactif 22 par *Pseudomonas luteola* (Chang et *al*., 2001)

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).
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 cancérogènes (Hsueh et Chen, 2007).

III. Communauté bactérienne rhizosphérique

1. Définition et structure

En Ecologie, une communauté est généralement définie comme un ensemble de populations, i.e. d'individus de différentes espèces qui coexistent en même temps et au même endroit (Begon *et al.* 1996). Mais cette définition est trop générale pour être appliquée directement aux communautés bactériennes. L'écologie microbienne a attribué le terme communauté pour désigner des assemblages d'espèces bactériennes qui sont en interaction dans un même écosystème, milieu, habitat et/ou qui partagent une même fonction (Paul et Clarck ;1996).
Une communauté bactérienne correspond donc à l'ensemble des populations bactériennes dans un habitat donné. Chaque espèce de la communauté prend part un système d'interactions complexes existant dans la rhizosphère entre le sol, les plantes et le biote du sol (Jossi, 2008).

2. Composition

Selon l'effet que les bactéries dans la rhizosphère peuvent exercer, ils peuvent être subdivisés en deux groupes, ceux à effets bénéfiques et ceux à effet pathogène.

2.1. Bactéries à effets bénéfiques

Les bactéries colonisant les racines qui exercent des effets bénéfiques sur le développement des plantes par des mécanismes directs ou indirects sont définies comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR/PGPB) **(**Anyia et *al*., 2009).

Les PGPB sont des bactéries du sol, de la rhizosphère, de la rhizoplane, de la phyllosphère ou endophytes qui, sous certaines conditions, sont bénéfiques pour les plantes (Bashan et de-Bashan, 2005).

Elles sont communément utilisées pour augmenter le rendement de diverses cultures (Bashan et al. 2008). Elles appartiennent à plusieurs genres incluant *Azospirillum, Azotobacter, Herbaspirillum, Bacillus, Burkholderia, Pseudomonas, Rhizobium* et *Gluconacetobacter, ...* (Pedraza, 2008).

Les PGPB sont divisées en deux groupes et pouvant stimuler la croissance des plantes de façon directe et indirecte. Le premier groupe influence directement le métabolisme de la plante en fournissant les substances qui sont habituellement en quantité limitée dans le sol. On y regroupe les bactéries capables de solubiliser les phosphates insolubles, d'augmenter la production des phytohormones et de fixer l'azote atmosphérique **(**Amarger, 2002 ;Bashan et al. 2008). Elles peuvent aussi augmenter la tolérance des plantes à divers stress tels les pesticides et le stress hydrique y compris la sécheresse (Cohen et al. 2009**)**.

Le deuxième groupe bactérien, nommé biocontrôle-PGPB, ne stimule pas directement le métabolisme de la plante. Par contre, il influence indirectement la croissance de celle-ci par la prévention des effets causés par des phytopathogènes tels des bactéries, des mycètes, des nématodes et des virus (Bashan et al. 2008).

2.2. Bactéries à effets pathogènes

Des interactions complexes existent entre les plantes et les bactéries qui leur sont associées.

En effet, on distingue des bactéries phytopathogènes et des bactéries déletères.

Les bactéries phytopathogènes peuvent exercer une action pathogène qui conduit à une réduction plus ou moins marqué du développement des plantes (Beniziri *et al.*, 2001). Alors que les bactéries délétères sont des pathogènes mineurs rhizosphériques, non-invasifs (n'entrant pas dans les tissus vasculaires) agissant par des mécanismes variés comme la production de phytotoxines, d'enzymes pectinolytiques, la compétition pour les nutriments avec la plante ou avec d'autres bactéries bénéfiques à la plante (Antoun *et al.*,1998).

3. Les facteurs influençant la structure de la communauté

La structure d'une communauté bactérienne est soumise à des fluctuations temporelles et spatiales qui correspondent à des phases de colonisation de nouveaux milieux ou de remplacement d'une communauté par une autre plus adaptée (Hassink , 1993). Beaucoup de paramètres interviennent pour modeler cette structure tant en termes de diversité que d'effectifs (Hassink, 1993, Borneman *et al.*, 1996 , Borneman et Triplett, 1997).Un certain nombre d'études ont toutefois permis d'identifier les facteurs présentant une influence marquée sur la structure des communautés bactériennes (Hassink , 1993).

3.1. Facteurs liés au sol

La structure des communautés bactériennes est variable et dépendante de nombreux facteurs. En effet, la structure des communautés bactériennes ainsi que sa composition peuvent varier considérablement suivant l'espace (Faugier, 2010). Plusieurs études ont montré que la structure des communautés bactériennes dans le sol et leur distribution est liée aux caractéristiques physico chimiques des sols. Le pH peut influencer fortement la composition bactérienne, il est l'un des forts prédicateurs de la composition de cette communauté et de leurs diversités, en effet une variation du pH du sol peut affecter sa composition.

La composition hydrique des sols est un facteur limitant des activités bactériennes, surtout dans les sols désertiques que dans d'autres environnements (Killian et Fehèr, 1939). Selon (Skujins 1986), la teneur en eau dans les sols désertiques n'a pas assez d'importance mais la grande importance est attachée au potentiel hydrique des sols. Ce dernier décrit essentiellement la force par laquelle l'eau est retenue dans le sol et l'énergie que les microorganismes devraient dépenser pour assimiler l'eau.

En conséquence, la croissance microbienne des sols de désert peut se produire la plupart du temps à de plus basses températures coïncidant avec la disponibilité prolongée de l'eau (Skujins, 1986).

Les conditions climatiques et les variations saisonnières provoquent des fluctuations considérables dans la densité et l'activité des communautés microbiennes. (Killian et Fehèr 1939) ont démontré que le nombre des bactéries a augmenté de 1,6 10^4 jusqu' au 1.510^6 UFC par gramme de sol durant la période pluvieuse dans les sols désertique du grande Sahara Algérien. De même, dans un sol oasien ou la teneur en eau dans le sol est élevée.

3.2. Facteurs liés à la plante

Dans un écosystème, la disponibilité des ressources nutritives est un facteur limitant. Il existe une forte relation entre le taux de carbone organique dissous et la composition des communautés bactériennes (Iribar, 2007). En effet au niveau de la rhizosphère, la quantité et la qualité des exsudats racinaire fournit par les plantes peuvent influencer fortement sa composition bactérienne, on parle de l'effet rhizosphère. L'effet rhizosphère, décrit par Hiltner en 1904, suppose que de nombreux micro-organismes sont attirés par les nutriments (composés organiques) secrétés par les racines des plantes, et que sont utilisés par les micro-organismes comme source de carbone et d'énergie (Bais et al., 2006 ; Jossi, 2008).Les changements induits par les racines dans le sol environnant conduisent à l'adaptation des communautés bactériennes du sol et à la sélection des communautés spécifiques principalement constituées par les populations les plus compétentes (Gobat et al., 2004).

Des observations scientifiques ont montré que beaucoup de plantes sélectionnent des groupes de microorganismes spécifiques via l'exsudation de composés dans la rhizosphère, qui représente une association positive où les plantes fournissent le carbone pour la croissance microbienne et les microorganismes en retour fournissent des éléments majeurs tels que l'azote et le phosphore, ainsi qu'une protection contre les attaques des pathogènes et parasites (Zoe et Cardon, 2007).

L'apport trophique racinaire influence la densité des populations bactériennes présentes dans la rhizosphère (environ 10^6 microorganismes par gramme de sol). En effet, Lynch et Whipps (1990**),** ont indiqué que les populations bactériennes présentes sur les racines et dans la rhizosphère sont plus abondantes (5 à 50 fois plus) que dans le reste du sol.

La composition de ces populations rhizosphériques, pour un même sol, varie d'une plante à une autre, voire d'un cultivar à l'autre. Cet effet rhizosphère correspond à un recrutement de communautés microbiennes telluriques par la plante (Smalla *et al.*,2000).

3.3. Facteurs liés à la composition microbienne

Les bactéries partagent la rhizosphère avec d'autres organismes et des microorganismes. Beaucoup de recherches ont montré l'existence de phénomène de la compétition entre les microorganismes du sol vis-à-vis les sources de nutriments et de l'habitat (Varma et al., 2006). Les champignons mycorhiziens arbusculaires communément appelés mycorhizes et ensemble, ils représentent les deux principaux groupes de microorganismes bénéfiques qui colonisent la rhizosphère (Russo et al. 2005). Ces champignons peuvent sécréter des substances qui ont un effet sélectif sur la communauté microbienne (Marschner et Timonen, 2005).

Ainsi, leur colonisation peut influencer, le taux de croissance et l'organisation bactérienne en modifiant, entre autres, le nombre de bactéries aérobiques dans la rhizosphère (Barea et al. *2002b).* L'inverse est également vrai. À titre d'exemple, la relation symbiotique entre *Azospirillum.sp* et les champignons mycorhizes permet une amélioration de l'établissement de la bactérie dans la rhizosphère tout en favorisant la formation des mycorhizes (Barea et al. *2002b).*

3.4. Influence de la composition de la communauté microbienne rhizosphérique sur l'environnement

Les modifications dans la structure des communautés bactériennes associées à la rhizosphère au niveau génotypique ainsi qu'au niveau phénotypique, affectent les productions bactériennes et les interactions plantes-bactéries et peuvent générer un effet de rétroaction bénéfique ou délétère sur la plante (Jossi, 2008).

En raison de leur activité enzymatique et de leur grande capacité de concentration en élément, les micro-organismes peuvent être plus efficaces que les plantes en l'absorption des nutriments (Gobat et al., 2004). Cela pourrait conduire une concurrence plantes-bactéries ou à l'amélioration de la nutrition des plantes (Richardson et Simpson, 2011).

La plupart des plantes comptent sur les champignons mycorhizes pour l'acquisition de nutriments minéraux, en particulier pour l'absorption du phosphore, créant ainsi un flux préférentiel de nutriments travers les mycorhizes et en modifiant les capacités fonctionnelles de la microflore du sol (Frey-Klett et al.,2005 ; Ouahmane et al.,2007).
Les activités microbiennes affectent la croissance des plantes et la résistance à de nombreux égards (Lugtenberg et al.,2002), soit directement par la production d'hormones végétales telles que l'auxine (Patten et Glick, 2002), ou indirectement par la protection contre les agents pathogène, la production d'antibiotiques, ou la production d'acide cyanhydrique (Blumer et Haas, 2000 ;Jossi, 2008).

4. Effet de la plante sur les bactéries rhisosphérique

La plante y mobilise l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son développement et à sa croissance. Dans la rhizosphère jusqu'à 30 % des composés photosynthétisés par la plante sont remis à la disposition des micro-organismes qui y vivent par le biais d'un phénomène appelé exsudation racinaire. Ces exsudats racinaires incluent une grande quantité d'acides organiques et de sucres ainsi que des composés organiques complexes. Ils sont transformés en biomasse microbienne ou réoxydés en CO_2.

La richesse de la rhizosphère en sucres, en amino-acides, en acides organiques, en isoflavonoides, en régulateurs de croissance et en enzymes libérées par la plante, rend ce microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries (Paul et Clark, 1996).

Dans la rhizosphère, des interactions intenses et importantes prennent place entre trois composantes : la plante, le sol et les microorganismes. En effet, des interactions biochimiques et des échanges de signaux moléculaires entre les plantes et les microorganismes du sol ont été décrits. Ces interactions peuvent influencer significativement la croissance des plantes et le rendement de la récolte (Salamone et al., 2005). Les racines des plantes offrent une niche pour la prolifération des bactéries du sol qui profitent des exsudats racinaires (Wipps, 2001 ; Walter et Vega, 2007). La densité de la population bactérienne dans la rhizosphère peut atteindre un nombre 100 fois plus élevé que le sol non rhizosphérique, et plus de 15% de la surface racinaire peut être recouverte par les micro-colonies de divers groupes bactériens. De plus, ces bactéries utilisent les nutriments sécrétés par la plante –hôte pour leur croissance (Van Loon, 2007 ; Nannipieri et al., 2008).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

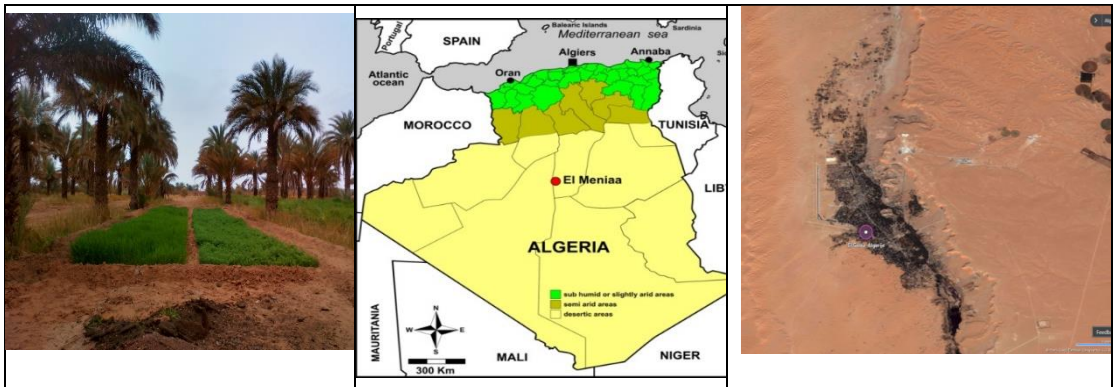
I. Matériel

1. Colorants

Pour la réalisation de notre travail, nous avons choisis deux colorants : le bleu de méthylène (BM) et le rouge congo (RC). Le choix de ces deux colorants est motivé par le fait que leur solubilité dans l'eau est élevée d'une part, et de leur utilisation en industrie textile d'autre part. Les colorants choisis appartiennent à la classe des xanthines (Le bleu de méthylène: un colorant cationique d'indice CI52015, de formule chimique C16H18N3SCl et une masse molaire de 319,85 $g.mol^{-1}$) et la classe des azoïques (Le rouge Congo: un colorant anionique (acide) de formule brute chimique C32H22N6O6S2Na2, de masse molaire 696,7 $g.mol^{-1}$) (Bandara et al., 1999)

2. Bactéries rhizosphérique

Les bactéries utilisées dans cette étude ont été isolés à partir du sol rhizosphérique associé aux plantules d'orge commun (*Hordeum vulgare* L.) cultivées (Fig.8.a) au niveau de la station expérimentale de l'Université des Sciences et de la Technologie, Houari Boumediene(USTHB), El Menia (30°37'00.8"N, 2°52'47.0"E) (Fig.8.b, c) durant la période Janvier-Avril 2021.



A	B	C

Figure 4. Localisation géographique de la wilaya d'El Menia (a) et vue satellitaire de la station de recherche expérimentale de l'université des sciences et de la technologie – USTHB-(b) et les zones de prélèvement du sol au niveau de la station (c).

Les 53 isolats ont été obtenus après un isolement sur milieu de culture TSA (Tryptose Soja Agar). Aprés une série de repiquage par stries, les isolats purifiés ont été conservés dans le glycerol 40% à une température de -20°C. Les isolats ont été nommés par le code RO, qui signifie Rhizosphère Orge, plus un numéro.

II. Méthodes

1. Evaluation de la capacité de biodégradation des colorants

1.1. Préparation de solutions colorants

Les solutions mères des deux colorants ont été préparées par l'addition d'une quantité déterminée (1 ²0g) de RC et de BM dans un volume d'eau distillée (1lite) avec agitation, pour obtenir une concentration de la solution mère de 100mg.L^{-1}.

À partir de la solution mère, une série des dilutions successives en appliquant la loi de dilution. (Roussac et al., 2004) a été réalisée afin d'obtenir des solutions de différentes concentrations : 10, 20,30,40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 mg.L^{-1}.

Le spectre d'absorption des solutions des deux colorants de différentes concentrations a été réalisés à l'aide de spectrophotomètre UV-Visible (UV-1600PC.VWR-634-6001). L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 530nm pour le RC et de 661nm pour le BM. L'ensemble des solutions à base des colorants a pour but d'élaborer une courbe d'étalonnage qui correspond la loi de Beer-Lambert.

1.2. Evaluation quantitative de la biodégradation des colorants

L'étude de la capacité de la biodégradation des deux colorants par les différents isolats rhizosphérique a été réalisée par un test présomptif pour chaque isolat.

Dans des flacons de 250 mL, 90mL du milieu TSB a été inoculé avec 1mL d'une suspension bactérienne d'une concentration de 10^8cellules.mL^{-1}. Après une incubation à 28°C pendant 24h et sous agitation (150rpm), la densité optique (DO) de la solution a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à une longueur d'onde de 660nm.

Après 24h d'incubation, 10mL de la solution colorant (20mg.L^{-1}) pour les deux colorants a été ajouté et puis l'ensemble a été incubé à 28°C et sous agitation (150rpm) pour une période de 5Jours.

Chaque 24h, des prélèvements de 2mL à partir des solutions inoculées et incubées ont été centrifugé à 9000tr.mn^{-1} pendant15 minutes afin d'éviter toute interférence d'absorbance provenant des débris cellulaires ou autres en suspension. Le surnageant obtenu a fait l'objet d'une mesure de la DOà une longueur d'onde de 660nm pour le bleu de méthylène et à 530nm pour le rouge congo.

La biodégradation des colorants a été estimée à l'aide de la formule suivante (Saratale et al., 2006). :

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

Avec :

Ai : Absorbance initiale à la longueur d'onde maximale du colorant.

Af : Absorbance finale après incubation à la longueur d'onde maximale du colorant.

La vitesse maximale de décoloration (ug/h)a été déterminée par la formule suivante (Jadhav et al.,2008):

$$\text{Vitesse moyenne de décoloration} = \frac{C_0 \times \%D \times 1000}{100 \times t}$$

Avec :

C0 :Concentration initiale du colorant donnée en mg.L^{-1}.

%D : Pourcentage de décoloration après un temps donné.

t : Temps d'incubation.

Le pH des solutions a été évalué après 24h pour les solutions des colorants préparés à l'aide d'un pH mètre.

Les mesures du pH et la biomasse bactérienne ont été effectués sur les isolats qui ont présenté une meilleure capacité de dégradation des deux colorants.

2. Influence des paramètres physico-chimique sur la cinétique de biodégradation

La capacité de biodégradation des colorants par l'isolat rhizosphérique a été évaluée sous divers conditions physico-chimique, il s'agit de la température d'incubation, le pH, la concentration initiale des colorants, sources carbonées et azotés et l'inoculum bactérien (Radhakrishnan et al.,2006). Cette optimisation a été effectuée sur les isolats qui ont présenté une meilleure capacité de dégradation des deux colorants.

2.1. Température

La température d'incubation est un facteur important dans l'étude de la biodégradation des colorants par la souche bactérienne.

Les isolats retenus (Agés de 24h) ont été inoculés dans des flacons de 250 mL remplis de 40 mL du milieu TSA et 10 mL de la solution colorant (20mg.mL^{-1}). L'incubation a été réaliseé sous agitation (150rpm) et sous différentes température à savoir 20, 30 et 40°C.

Après une incubation pendant 24h, la densité optique (DO) de la solution a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à une longueur d'onde de 660nm pour le BM et 530 nm pour le RC.

2.2. Potentiel hydrogène

L'effet du pH de la solution colorant sur la capacité de biodégradation des isolats a été réalisé avec des solutions à base des deux colorants et qui ont été préparé avec une gamme de pH (5 et 9).

Après une incubation à 28°C pendant 24H et sous agitation (150rpm), la densité optique (DO) de la solution a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à une longueur d'onde de 660nm pour le BM et 530nm pour le RC.

2.3. Concentration initiale des colorants

La concentration initiale de RC et BM est un facteur très important affectant le processus de biodégradation. Différentes concentrations ont été testées à savoir :10, 20, 30, 40 et 50 mg.L^{-1}.Après une incubation à 28°C pendant 24h et sous agitation (150rpm), la densité optique (DO) de la solution a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à une longueur d'onde de 660nm pour le BM et 530nm pour le RC.

2.4. Inoculum bactérien

La quantité de l'inoculum bactérien est considéré comme un facteur très important dans l'évaluation de l'optimisation de la biodégradation. Différents volumes de la suspension bactérienne ont été inoculé à savoir :250uL,500uL, 750 uL et 1mL.

Après une incubation à 28°C pendant 24h et sous agitation (150rpm), la densité optique (DO) de la solution a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à une longueur d'onde de 660nm pour le BM et 530nm pour le RC.

3. Evaluation de la phytotoxicité

Afin d'évaluer la toxicité des deux colorants avant et après la biodégradation (Saratale et al.,2013). Le test de phytotoxicité sur des graines de lentille a été réalisé.

Les graines de plantules de lentilles (*Lens culinaris*L.) (Tab.IV-Fig.5) de la variété SYRIE ont été collectées au niveau de la région de Chlef durant l'année 2019.



A1 **A2** **A3**

Figure 5 :
Traitsmorphologiques des plantules de lentille.

A1. Plante entière. A2. Fleurs.
A3. Graines

Tableau IV. Classification botanique de lentilles (Bouzid, 2017).

Nom Commun	Règne	Embranchment	Classe	Sous classe	Famille	Ordre	Genre
Lentilles	Plantae	Spermatophyta	Magnoliophyta	Rosidae	Légumineuse	Fabales	*Lens*

3.1. Stérilisation des graines

Les graines ont été placées dans une solution saline tampon (PB) additionnée de silweet 77% pendant 24 h sous agitation (150rpm). La surface des graines a été stérilisée par une immersion dans de l'alcool 75° pendant 30s suivie d'un rinçage avec l'eau distillée stérile, puis une immersion durant 3mn dans de l'hypochlorite de calcium ($CaCl_2O_2$) à 5.25% et enfin un rinçage a été effectuée 6 fois avec de l'eau distillée stérile (Bouherama et al.2021). Afin de vérifier l'efficacité de la désinfection en surface, 5graines ont été ensemencées sur des milieux de culture TSA et incubées pendant 24 à 48h à 30±2°C.

3.2. Mise en place de la germination des graines

Dans chaque boite de Petri, 5 graines stériles ont été mises à germer sur une couche de papier Whatman préalablement stérilisé sous UV pendant 4h. Les graines ont été irrigués par différentes solutions (Tab.V) en raison de 2mL par jour (Tiar et al.,2018) puis incubées à 25°C à l'obscurité pendant 5 jours.

Tableau V. Les différentes solutions utilisées pour l'irrigation des graines de lentilles.

Solution	Traitement
Eau distilée stérile	Témoin négatif (TN)
Solution de BM 20mg/l	Témoin positif (TBM)
Solution de RC 20mg/l	Témoin positif (TRC)
Solutions de BM 20mg/l après inoculation avec les isolats	Solutions de biodégradation (BM1, BM2, BM3,...)
Solutions de RC 20mg/l après biodégrdation par les isolats	Solutions de biodégradation (RC1, RC2, RC3,...)

3.3. Evaluation de la toxicité

La détermination de l'effet de la toxicité des colorants et /ou les métabolites issus de leur biodégradation a été réalisé par le calcul de taux de germination.

Taux de germination (%)= Nombre des graines germées/Nombre des graines totale × 100.

4. Caractérisation phénotypique des isolats

4.1.Caractérisation morphologique

4.1.1. Aspect coloniale

Les colonies obtenues sur milieu solide ont été observées d'abord à l'œil nu. L'étude macroscopique permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification, elle est basée sur les éléments d'identification donnés par Joffin et Leyral (2006): la forme, la taille, l'opacité, l'élévation et l'aspect de contour et de surface.

4.1.2. Aspect cellulaire

4.1.2.1. Observation à l'état frais

L'observation à l'état frais permet d'explorer la mobilité des cellules bactériennes et le mode de groupement et de faire une approche de leur morphologie (Bousseboua, 2002). Une petite goutte d'eau physiologique stérile à été déposée au centre d'une lame stérile, puis une partie d'une colonie bactérienne jeune (18h) à été prélevée par l'anse flambée et dissociée dans la goutte, une lamelle stérile a été ensuite appliquée sur la goutte en évitant la formation des bulles d'air. L'observation microscopique a été réalisée à l'objectif X40 puis X100 (Joffin et Leyral, 2005).

4.1.2.2. Observation à l'état fixé

L'identification morphologique des colonies à l'état fixé consiste à une observation microscopique après coloration de Gram (Marchal et Bourdon,1982).

La coloration de Gram est une coloration différentielle de base permet de distinguer deux grands groupes bactériens en fonction de la composition de leurs parois et de leurs affinités aux différents colorants : des bactéries à Gram positifs colorées en violette et Gram à négatifs en rose, et elle permet aussi de déterminer la forme, la taille, l'arrangement, la nature biochimique de la paroi des cellules bactériennes, la vérification de la pureté de l'isolat et permet de visualiser les endospores bactériennes, leurs formes et leurs positionnements.

Un frottis fixé à la chaleur a été coloré pendant une minute au violet de cristal suivie d'un rinçage rapide à l'eau distillée, puis traité pendant une minute par une solution de lugol, et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée. Une décoloration du frottis a été réalisée par un traitant avec l'éthanol 95% pendant 15 à 30 secondes puis rincé à l'eau distillée. Ensuite le frottis a été coloré par la fushine pendant 10 à 30 secondes et après un bref rinçage à l'eau distillée, le séchage du frottis au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec Bünsena été réalisé. L'examen au microscope a été réalisé aux grossissements x40 et x100 à immersion.

4.2. 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 tube . Incubation dure 24 heures à 37c°

4.2.1. Catalase

Ce test a pour but de mettre en évidence l'acquisition des bactéries de l'enzyme catalase qui dégrade le peroxyde d'oxygène en H_2O_2 en H_2O et O_2.

L'examen a été effectué sur une lame propre et sèche. Une goutte de la crème oxydant à 30 volumes a été déposé puis à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée l'inoculum bactérien a été ajouté ajouter. Un dégagement immédiat des bulles d'air signifie la présence de l'enzyme.

4.2.2. Oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi quinonique rose violacé.

Le test oxydase a été réalisé grâce à des disques d'oxydase prêts à l'emploi contenant de l'oxalate N-diméthyl -paraphényléne diamine. Les disques ont placés sur une lame et une colonie y est déposée avec une pipette Pasteur.

Les bactéries oxydase positives dégradent le substrat sur le disque et donnent une coloration violette foncée après quelques secondes (Marchall et *al*., 1982).

4.2.3. Mobilité

L'étude de la mobilité a été réalisée sur milieu Mannitol-mobilité.Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol, la mobilité et la réduction du nitrate (enzyme respiratoire).Le test a été procédé par l'ensemencement de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur, par piqûre centrale, jusqu'au fond du tube de gélose, incubée pendant 24 heures à 30°C.

La fermentation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du milieu de culture au jaune et les bactéries mobiles envahissent le milieu de culture à partir du point d'ensemencement (Bouras, 2018).

4.3. Caractérisation physiologique

Pour une caractérisation physiologique de nos isolats, nous avons retenus un ensemble de critères, il s'agit de : salinité, stress hydrique,température, pH,l'alcalinisation/acidification du milieu et la résistance aux antibiotiques et métaux lourds.

La tolérance à la salinité, le stress hydrique, l'alcalinisation/acidification du milieu et la résistance aux antibiotiques et métaux lourds ont été testé sur des plaques de titration de 96 puits. Le milieu TSB1/10 a été additionné de 5g.l^{-1} d'Agar afin d'avoir un milieu semi solide puis 150ul de bleu de bromothymol préalablement stérilisé par filtration (0.45um) est ajouté comme indicateur de pH.

Après ensemencement par piqure central dans les puits les boites ont été incubées à 25C° pendant 24h , la croissance des souches qui se traduit, par comparaison à des puits témoins,par un virage du bleu de bromothymol vers le jaune dans le cas des souches acidifiantes ou vers le bleu dans le cas des souches alcalinisantes, lorsque ce virage n'est pas obtenu, dans le cas des souches neutres, les puits ont été observés à l'œil nu pour rechercher un trouble ou le développement de petites colonies révélateurs d'une croissance bactérienne qui indique la tolérance de la bactérie.

4.3.1. Température

Pour étudier l'effet de la température d'incubation sur la croissance de nos isolats, des cultures bactériennes jeunes (24h) ont été inoculés sur milieu TSB1/10 et incubées pendant 24-48h sous agitation (150rpm) à différentes températures : 10°C, 20°C,30°C et 40°C. La biomasse a été déterminée par une mesure de l'absorbance de la solution à une longueur d'onde de 660nm .

4.3.2. pH

Afin de tester la capacité des bactéries à se développer en milieu alcalin et / ou acide, le milieu TSB1/10 a été préparé puis ajusté par l'addition de HCl 1M et /ou du KOH1M pour obtenir une gamme de pH de: 4, 7,10 et 12.

Des cultures bactériennes jeunes (24h) ont été inoculés sur milieu TSB1/10de différents pH puis incubées pendant 24-48h sous agitation (150rpm) et à 28±2°C. La biomasse a été déterminée par une mesure de l'absorbance de la solution à une longueur d'onde de 660nm

4.3.3. Salinité

Pour évaluer la capacité denossouches à croître dans les conditions de salinité, différents concentrations de NaCl ont été ajouté au milieu de culture, il s'agit de 100mM, 200mM et 300mM.

Des cultures bactériennes jeunes (24H) ont été inoculés sur milieu TSB1/10 à différentes concentration de salinité puis incubées pendant 24-48h sous agitation (150rpm) et à 28±2°C. La biomasse a été déterminée par une mesure de l'absorbance de la solution à une longueur d'onde de 660nm.

4.4. Activité enzymatique

4.4.1. Amylase

L'amylase est l'enzyme qui a la capacité d'hydrolyser l'amidon. La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries permet une dégradation de la matière organique dans la nature et fournir des éléments minéraux que les plantes vont utiliser pour leur croissance (Raj et *al*., 2009).

La recherche de la présence de l'enzyme amylase chez nos isolats a été détectée sur milieu TSA 1/10 additionnée d'amidon à 1%. Après un ensemencement par spot, les boites ont été incubées à 28±2°Cpendant 5 jours. La révélation se fait par l'inondation des boites par une solution iodée (Lugol)(Annexe 1). L'hydrolyse de l'amidon se traduit par un halo clair autour de la colonie, contrairement aux zones contenant de l'amidon qui se colorent en bleu (Delarras, 2014).Le diamètre du halo d'hydrolyse est obtenu en soustrayant le diamètre de la colonie de celui diamètre total pour chaque isolat.

4.4.2. Gélatinase

La capacité de nos isolats à dégrader la gélatine est testée sur un milieu à base de gélatine (Annexe 2) solidifiée dans des tubes en culot. Les souches étudiées ont été ensemencées par piqure centrale puis incubés à 25°C pendant15 jours.

A la fin de l'incubation les tubes ontété placés au froid (+4°C) pendant une heure. Le résultat est dit positif si le tube reste liquide même après passage au froid. (Delarras, 2014).

4.4.3. Protéase

Les protéases jouent un rôle significatif dans la minéralisation de l'azote dans le sol. C'est un processus important dans la disponibilité de l'azote et donc dans la croissance des plantes. (Petit et Jobin, 2005 ; Nannipieri et *al*., 2011). Ils jouent également un rôle important dans la lyse de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (Elad et Kapat ,1999).

L'étude de l'activité protéolytique de nos souches a été mise en évidence selon la méthode décrite par de Smibert et Krieg (1994). Les souches tests ont été ensemencées par spot sur milieu de culture géloséadditionné de lait écrémé(Annexe 2), ces souches ont été incubées à une température de 28°C pendant 48h. La lecture positive se manifeste par le développement d'un halo clair autour des colonies ensemencées (Naik et Sakthivel, 2006).

4.4.4. Lipase

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou *oil bodies*) (Beisson et al., 2001).

Sous l'action des lipases, ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante (Adlercreutz et al., 1997).

La production des lipases par nos isolats a été testé sur le milieu de culture décrit par Sierra (1957) qui contient en g/l : peptone (10) ; NaCl (5) ; $CaCl_2.H_2O$ (0.1) ; Agar (18), Tween 80 (1%, v/v) est ajouté pour révéler l'activité estérasique.

Le pH est ajusté à 7,4 (Carrim et *al.,* 2006). Après ensemencement, les boites ont été incubées à 30C° pendant 48h. La présence d'une activité est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

4.4.5. Uréase

L'uréase est l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'urée pour produire le CO_2 et l'ammoniac (NH_3).ce qui augmente la disponibilité de l'azote pour les plantes (Yang et *al*., 2006 ; Martinez-Salgado et *al*.,2010).

Afin de vérifier la présence de l'uréase chez nos souches, nous avons préparé un milieu à base de peptone et d'un volume de 950 ml (Annexe 1),le milieu a été ajusté à pH 6,8. Après autoclavage, 50 ml d'une solution d'urée à 40%, préalablement stérilisée par filtration (0.22 µm), a été ajoutée. Après ensemencement par spot de nos isolats l'activité uréasique est traduite par la présence d'un halo rose autour des colonies (Christensen, 1946).

4.4.6. Cellulase

Les cellulases sont des enzymes inductibles synthétisées par une grande diversité de microorganismes comprenant les champignons et les bactéries pendant leur croissance sur les matériaux cellulosiques, ces enzymes ont constituent une cible pour les recherches académiques aussi bien industrielles (Sukumaran et *al*., 2005).

L'activité cellulolytique a été mise en évidence en utilisant un milieu liquide où la source de carbone est apportée par une feuille du papier filtre en forme des bandelettes qui a été déposé verticalement débordant le niveau liquide dans des tubes à essai. Un inoculum d'une souche jeune a été ensemencé dans chaque tube et porté à incubation à 25°C pendant15 jours.

La lecture fait appelle à une légère agitation, les bactéries cellulolytiques attaquent le papier et finissent par le découper (Pochon et Tardieux ,1962).

5. Formation des spores

La détermination de la capacité de nos isolats à forrmer des spores a été réalisé suite à un prétraitement thermique. La température a pour but d'éliminer toutes les formes végétatives (Vinter, 1987). Les isolats jeunes (18H) ont été inoculés dans des tubes à essai contenant 20mL de TSB puits incubés à 28±2°C sous agitation 150 rpm pendant 24h. Après l'incubation, un chauffage dans un bain marie à 80°C pendant une heure a été réalisé suivi d'un ensemencement sur un milieu TSA 1/10 et une incubation à 28±2°C pendant 24 à 48h. La croissance des colonies sur la surface du milieu indique une capacité de sporulation.

6. Formation de biofilm

La formation de biofilm a été recherchée sur le milieu Rouge Congo (Annexe 2). Par ensemencement en stries à la surface d'une boite de gélose Rouge Congo (RCA). La lecture a été faite après 24 heures d'incubation à 37°C (Touati et *al*, 2007).

Les souches productrices de biofilmforment des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Nasr et *al*, 2012).

7. Test d'agglutination (Salting Aggregation Test_SAT)

Le Test d'agglutination (SAT) est basé sur la précipitation des bactéries en présence de différentes concentration de sulfate d'ammonium [($NH_4)_2$ SO_4] (Balebona et al ,2001; Basson et al ., 2008).Au centre d'une lame propre, 25 ul de sulfate d'ammonium ont été soigneusement additionnés à 25 ul de chaque suspension bactérienne jeune des isolats retenus. Différentes concentration de sulfate d'ammonium ont été testées : 0.2- 0.5- 1- 1.5 - 2- 2.5- 3 et 4 M . (Basson et al , 2008).

Apres 2 à 4 mn de mélange, à température ambiante, l'agrégation descellules bactériens est observée sous forme de petits amas. La concentration maximal de $(NH_4)_2SO_4$ qui permet, l'agrégation des cellules bactériens sera considérée comme la valeur SAT .

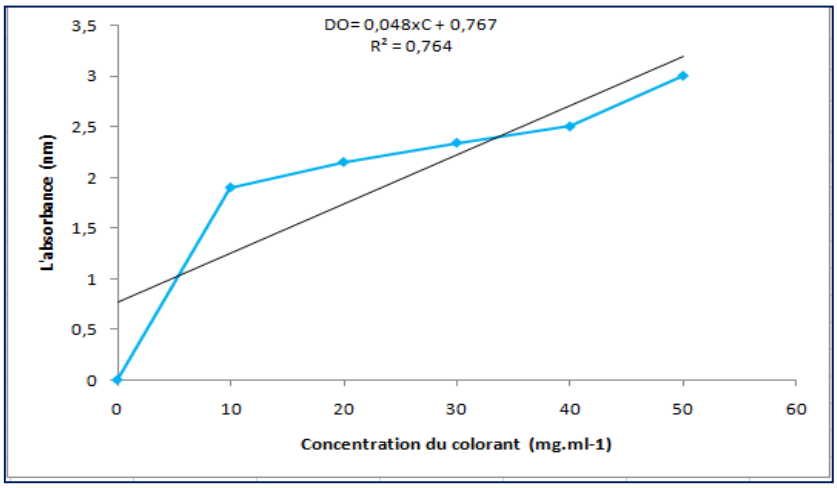
(0.1M – bactéries Très Hydrophobe , 0.1- 1M .Hydrophobe) 1M = bactéries hydrophobeon garde ça pour lecture des résultats.

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

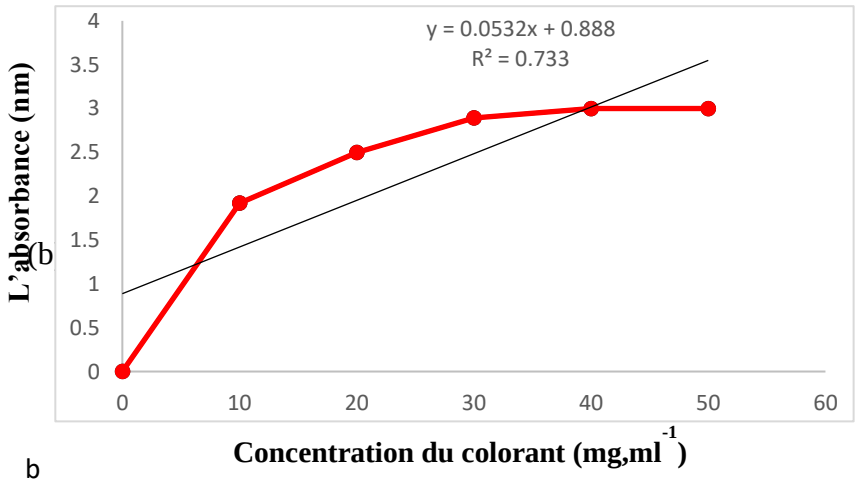
I. Évaluation de la capacité de biodégradation des colorants par les bactéries rhizosphérique

1. Evaluation de la capacité de biodégradation

La détermination des absorbances de la gamme étalon des deux colorants testés à savoir le bleu de méthylène (BM) et le rouge congo (RC) à différentes concentrations au λmax correspondante de chaque colorant, nous a permis de tracer les courbes étalons (Fig 6). Les courbes étalons obtenus permettre de les utiliser comme outil de dosage du colorant au cours des cinétiques de biodégradation.



(a)



(b

b

Figure 6. Courbe d'étalonnage du bleu de méthylène (a) et du Rouge de Congo (b).

Afin de déterminer la capacité de nos 53 isolats rhizosphérique à dégrader les deux colorants, une suspension bactérienne âgée de 24h a été ensemencée en raison de 10% de la solution colorant. Le suivi de la dégradation des colorants a été estimé par une mesure quotidienne de la densité optique pour une période de cinq jours. La DO mesurée a été utilisé pour calculer les taux de biodégradabilité.

Nos résultats (Tab VI) ont montré que sur les 53 isolats testés, 34 isolats ont montré un taux de biodégradabilité négatif. Ce résultat reste inexpliqué et nous a conduits à les considérer comme des bactéries incapables de dégrader le bleu de méthylène.

Pour les 20 isolats restants, 9 isolats ont montré un taux de biodégradation supérieur à 25% dont 6 isolats, le taux de biodégradation est supérieur à 50%. Ce taux augmente pour atteindre 79% pour l'isolat B1 et 72% pour l'isolat B3 au delà du troisième jour d'incubation.

Au bout du quatrième jour, les isolats B6 et D4 ont montré une augmentation du taux de biodégradation de BM pour atteindre 38% et 34% respectivement alors que pour les isolats A3 et A7, le taux de biodégradation de BM arrive à 58% et 51% respectivement.

Tableau VI. Cinétique de la biodégradation du bleu de méthylène.

Code isolats	JOUR 1	JOUR 2	JOUR 3	JOUR 4
A2	6,88%	-29,96%	-25,12%	12,33%
A3	9,26%	46,62%	50,02%	58,67%
A7	2,93%	-24,05%	-1,16%	51,93%
A9	33,31%	-25,59%	36,66%	-23,12%
A10	43,36%	42,76%	-6,28%	-15,49%
B1	55,19%	60,40%	79,89%	52,86%
B3	55,51%	72,40%	64,16%	58,86%
B6	19,86%	20,19%	29,96%	38,71%
B10	71,75%	62,30%	67,33%	-2,51%
B11	9,72%	13,07%	29,26%	-3,25%
C1	8,18%	59,95%	44,90%	2,23%
C3	5,72%	6,79%	31,87%	-6,70%
C4	53,83%	61,47%	31,59%	-4,42%
C5	2,28%	24,47%	19,73%	-17,49%
D4	18,93%	20,42%	23,49%	34,57%
D9	0,23%	-16,84%	-18,14%	-4,93%
D11	26,61%	-24,98%	-24,66%	-7,25%
E1	57,60%	13,40%	20,52%	66,72%
E4	49,37%	46,48%	44,25%	49,62%

Cette capacité d'utiliser le bleu de méthylène comme substrat pour leur croissance a été déjà observé chez de nombreux groupes bactériens. En effet, un groupe de l'université de l'Idaho a testé la capacité des microorganismes ligninolytiques: champignons blancs de putréfaction et *Streptomyces*, à décolorer et minéraliser des colorants textiles (Zhou et *al*.,1993).Aussi, Ball et *al.,*1989, ont testé 20 souches d'actinobactéries, représentant un large éventail de ce genre, pour leur capacité à décolorer le Poly R (colorants alimentaire).

La dégradation des colorants par les bactéries peut être expliquée par la capacité des bactéries à produire des peroxydas extracellulaires qui jouent un rôle primordial dans la biodégradation de la lignine (Oxydation), aboutissant à la production de composés polymériques hydrosolubles.

17 isolats ont été sélectionnés et ont été testé pour leur capacité à dégrader le rouge congo. Les résultats obtenus (Tab VII) ont montré que l'ensemble des 17 isolats ont présenté un taux de biodégradation supérieur à 25%, et 13 isolats ont présenté un taux de biodégradation supérieur à 50%. Les isolats B5, B11 et E4 ont des taux de biodégradation de 81%, 80% et 84% respectivement.

Au bout du cinquième jour, 16 isolats ont présenté un taux de biodégradation supérieur à 50%. Les isolats B3 et C1 ont montré des taux de biodégradation de 45% et 43% respectivement.

Les bactéries présentent un potentiel variable de dégradation de divers colorants synthétiques. (Chengalroyen,2011) a examiné le comportement de décoloration des espèces de Streptomyces contre deux colorants structurellement différents (rouge Congo et orange II). Les espèces de Streptomyces sont pu décolorer le colorant rouge Congo structurellement complexe avec deux liaisons azoïques et des groupes poly aromatiques et sulfonés, tandis que le colorant structurellement plus simple Orange II (avec une seule liaison azoïque et un groupe sulfoné) n'a pas été décomposé. La biodégradation des colorants triphénylméthanes par deux actinobactéries, tels que *Nocardia corallina* et *Nocardia globerula*, a été signalée par (Yatome et al., 1991).

Étant donné que seulement 4% de la décoloration s'est produite par adsorption, on peut donc suggérer que le processus est principalement dû à la dégradation du colorant. Les composants hétéropolysaccharidiques et lipidiques de la paroi cellulaire contribuent à la capacité de biosorption d'un micro-organisme qui à son tour conduit à une forte force

d'attraction entre le colorant azoïque et la paroi cellulaire (Solís et al. 2012). L'adsorption du colorant a été principalement signalée dans des isolats fongiques en raison de leur grande surface et seulement dans quelques bactéries où une production supplémentaire de polysaccharides a été trouvée (Binupriya et al. 2010).

Tableau VII. Cinétique de la biodégradation du rouge congo.

Code isolat	JOUR 1	JOUR 2	JOUR 3	JOUR 4	JOUR 5
A3	46,90%	52,50%	56,22%	52,86%	55,14%
A9	36,85%	38,26%	58,90%	61,74%	64,11%
A10	62,06%	64,51%	63,71%	61,26%	61,78%
A11	57,06%	67,55%	66,59%	66,91%	70,35%
B1	38,46%	40,94%	43,58%	47,70%	53,34%
B3	34,25%	36,21%	41,94%	42,70%	45,34%
B4	50,10%	68,83%	72,79%	73,15%	57,94%
B5	81,19%	85,99%	81,35%	80,87%	82,11%
B6	39,78%	46,50%	55,86%	56,58%	56,98%
B10	66,55%	71,39%	70,99%	55,14%	68,75%
B11	80,51%	84,35%	69,07%		
C1	35,17%	38,90%	43,66%	43,42%	43,94%
C4	54,90%	68,95%	73,35%	75,31%	78,07%
D4	49,66%	65,79%	64,27%	65,15%	69,87%
E1	61,14%	74,15%	78,91%	82,23%	85,55%
E4	84,99%	86,67%	80,87%	81,83%	83,39%
E5	79,47%	86,59%	81,55%	82,79%	82,27%

2.Influence des paramètres physico-chimique sur la cinétique de 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).

2.1. Température

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

Tableau VIII. Effet de la température sur la biodégradation des colorants.

BM.Bleu de méthylène.RC.Rouge Congo

Code isolats	BM		RC	
	20°C	**40°C**	**20°C**	**40°C**
T	24%	23,78%	71%	23,77%
A3	25%	25,48%	53%	13,66%
A9	26%	25,97%	58%	16,16%
A10	23%	23,08%	53%	14,89%
A11	18%	17,71%	62%	21,94%
B1	27%	26,78%	52%	12,75%
B3	21%	21,43%	61%	19,59%
B4	22%	21,75%	56%	17,34%
B5	23%	22,62%	63%	20,31%
B6	21%	21,13%	64%	21,54%
B10	25%	24,80%	59%	17,33%
B11	20%	19,64%	63%	21,92%
C1	27%	27,27%	62%	17,27%
C4	25%	24,64%	64%	19,43%
D4	26%	26,43%	62%	17,90%
E1	21%	20,75%	61%	20,03%
E4	24%	24,20%	63%	19,30%
E5	21%	21,48%	58%	18,40%

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).

2.2. Potentiel hydrogène

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).

Nos résultats (Tab IX) ont montré que la dégradation du bleu de méthylène n'a pas été affecté ni par l'ajout des différentes suspensions bactériennes ni la température d'incubation.

Tableau IX. Effet de PH sur la biodégradation des colorants.

BM.Bleu de méthylène.RC.Rouge Congo

Code des isolats	PH=5		pH=9	
	BM	**RC**	**BM**	**RC**
T	20%	75%	24%	73%
A3	5%	49%	19%	47%
A9	18%	54%	23%	55%
A10	33%	59%	25%	60%
A11	32%	52%	24%	45%
B1	24%	52%	22%	57%
B3	35%	44%	46%	60%
B4	31%	79%	25%	54%
B5	31%	64%	46%	61%
B6	6%	62%	22%	59%
B10	37%	77%	23%	50%
B11	20%	48%	11%	49%
C1	30%	46%	24%	49%
C4	16%	49%	24%	50%
D4	22%	65%	27%	59%
E1	34%	61%	22%	52%
E4	32%	44%	26%	54%
E5	3%	49%	8%	58%

2.3. Concentration initiale des colorants

La décoloration de bleu méthylène a été étudiée à diverses concentrations croissantes. Les résultats obtenus ont démontrés une faible dégradation a été notée avec les concentrations 30 $mg.l^{-1}$ et 40 $mg.l^{-1}$ avec une pourcentage qui ne dépasse pas 50 % .

Tableau X. Concentration initiale des colorants

BM.Bleu de méthylène.RC.Rouge Congo

Code d'isolats	BM		RC	
	30 mg.l^{-1}	40 mg.l^{-1}	30 mg.l^{-1}	40 mg.l^{-1}
T	20%	75%	24%	73%
A3	40%	39%	47%	33%
A9	39%	46%	39%	33%
A10	37%	24%	47%	34%
A11	34%	35%	44%	32%
B1	40%	25%	46%	32%
B3	34%	31%	48%	35%
B4	33%	45%	53%	38%
B5	34%	50%	60%	31%
B6	43%	29%	55%	44%
B10	40%	33%	52%	36%
B11	32%	21%	50%	30%
C1	35%	39%	51%	37%
C4	39%	38%	54%	31%
D4	32%	39%	47%	33%
E1	46%	37%	50%	34%
E4	39%	43%	34%	40%
E5	36%	23%	50%	43%

La concentration du colorant influence sur efficacité de leur élimination. Les colorants sont éliminés facilement lorsque la concentration se situe entre 1 et 10 µM, et sera réduit à la concentration 30 µM (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 y a alors une relation entre la concentration du colorant et le temps requis pour sa décoloration (Satyendra et Manikant, 2017).

2.4. Inoculum bactérien

La dégradation de bleu méthylène et le rouge congo a été étudiée à diverses concentrations de l'inoculum bactériens additionnée à la solution des colorants. Les résultats obtenus ont démontré qu'à des faibles concentrations d'inoculum la dégradation a été notée.

Tableau XI. Effet de l'inoculum bactérien sur la biodégradation des colorants.

BM.Bleu de méthylène.RC.Rouge Congo

	BM			RC		
	25 µL	**50 µL**	**75µL**	**25 µL**	**50 µL**	**75µL**
A3	-7%	-8%	3%	69%	70%	59%
A9	-18%	-19%	-12%	51%	75%	68%
A10	42%	-33%	-25%	57%	68%	57%
A11	19%	-30%	36%	58%	63%	64%
B1	-4%	-15%	-18%	50%	69%	54%
B3	-26%	-31%	-8%	52%	70%	60%
B4	22%	-27%	60%	55%	66%	60%
B5	-25%	-29%	53%	61%	63%	63%
B6	-32%	21%	-2%	60%	66%	60%
B10	16%	1%	-9%	61%	66%	66%
B11	7%	3%	-8%	64%	58%	49%
C1	36%	-31%	-28%	63%	72%	60%
C4	-31%	7%	-26%	63%	52%	57%
D4	-8%	-28%	-5%	62%	59%	56%
E1	-7%	-8%	20%	62%	66%	61%
E4	-23%	-30%	0%	51%	51%	61%
E5	-10%	-14%	28%	43%	43%	40%

3. Evaluation de la phytotoxicité

L'activité humaine est responsable pour une grande partie de la pollution de l'environnement et des écosystèmes. Il est donc important d'essayer d'évaluer les risques toxiques que représentent les eaux usées enrichies par ces différents produits polluants, sources de contamination. La phytotoxicité présente l'un des facteurs déterminant pour évaluer ces risques.

La phytotoxicité des deux colorants (BM et RC) a été évalué par une détermination du taux de germination cumulé des graines de *Lens culinaris* L. après 10 jours de suivie.

Dans les conditions normales (En absence de colorants), les graines de lentilles ont présenté un taux de germination cumulée de 60%. Ce taux est considérée comme faible, il est conditionné par un ensemble de facteurs tel que la viabilité des graines et la qualité de l'eau d'irrigation (Barbier et *al.*, 2012).

Avec une irrigation avec les colorants, le taux de germination (Fig.7) diminue significativement ($P<0.05$) avec le BM alors qu'il reste constant avec le RC. Cette réaction négative du bleu de methylène sur la germination des graines de lentilles peut être expliquée par la toxicité du colorant (Kifuani et al.,2018). Cependant, aucune étude n'a été réalisée auparavant sur la phytotoxicité du BM.

L'utilisation de nos 17 isolats comme inoculum additionné aux solutions de BM et RC pour servir à l'irrigation des graines de lentilles a montré que lorsque le colorant utilisé est le RC, 9 isolats : A3, A9, B4, C1, C4, D4,E1, E4 et E5 ont permis une augmentation significative ($P<0.05$) du taux de germination cumulé et arrive à 100% de graines germées. Ces isolats ont pu dégrader le rouge congo et les métabolites issus de cette dégradation ont favorisé la germination des graines de lentilles même meilleure qu'avec l'eau distillée. Bien que les colorants azoïque sont peu dégradable mais l'action des bactéries a libérer des métabolites plus efficace. Ces bactéries peuvent être étudiées pour leur potentiel de biodégradation et biorestauration.

Les isolats A10 et A11 ont conduit à une diminution significative ($P<0.05$) du taux de germination cumulé. Cette diminution peut être expliquée par la nature toxique des produits issus de la dégradation du RC. La toxicité des azoïques par exposition aux colorants et à leurs métabolites n'est pas un fait nouveau, les travaux effectués sur ces colorants ont démontré que ces composés chimiques présentaient des effets cancérigènes pour l'homme et l'animal (Bauer et al.,2001 ;WHO,1982). Avec les isolats B5, B6 et B11, une légère diminution du taux de germination cumulé a été observée.

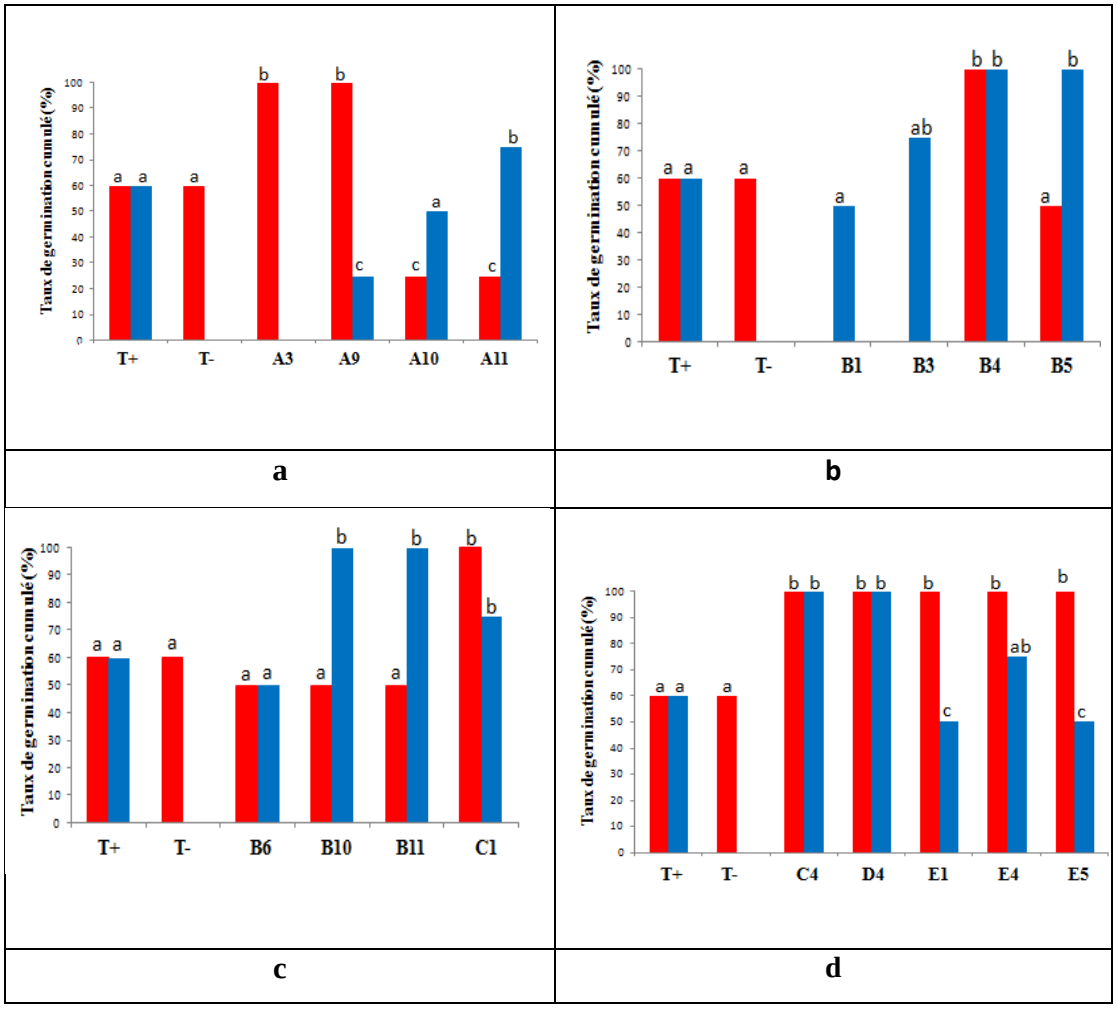


Figure 7. Taux de germination cumulé des graines de lentilles (*Lens culinaris* L.) sous irrigation avec les colorants.

T+.Graines témoin irriguées avec l'eau distillée. T-.Graines témoin irriguées avec les colorants BM et RC. Les histogrammes sont la moyenne de trois répétions portant des lettres a,b,c représentant les résultat du test ANOVA-LSD à P<0.05.Histogrammes en rouge. Rouge congo. Histogramme en bleu. Bleu de méthylène.

Lorsque la solution d'irrigation est le bleu de méthylène ajouté à des suspensions bactériennes, le taux de germination cumulé a montré une augmentation significative (P<0.05) pour arriver à 100 % avec les isolats : C4, B4, D4, B5, B10 et B11 et à 75 % avec les isolats A11, B3, E4 et C1. Une augmentation légère mais significative a été noté avec les isolats A10 B1 E1 B6 E5 et A9 qui ont donné des taux cumulé de germination de 50% et 25%. L'utilisation des suspension bactériennes a permis la dégradation du bleu de méthylène et cette dégradation a générer des métabolites et sous produits moins toxique et même bénéfique pour la germination des graines.

4.Caractérisation des isolats

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. En dehors de ces informations utiles dans l'étude de la biodiversité et la taxonomie, notamment polyphasique, les caractères phénotypiques offrent des opportunités pour sélectionner des souches efficientes, compétentes et indifférentes aux divers stress environnementaux. Plusieurs critères phénotypiques ont été retenus pour cette étude afin de mieux caractériser nos isolats.

4.1. Caractérisation morphologique

Les 17 isolats présentant le meilleur pouvoir de biodégradation des deux colorants à la fois forment sur le milieu TSA des colonies visibles à l'œil nu après 18-24h d'incubation à 28°C, leur taux de croissance est donc peu variable.

Les colonies formées par nos isolats sont toutes circulaires, de texture homogène, à bord régulier et à élévation convexe. Elles sont de couleur blanche ou crème et ne montrent pas de pigmentation ou de fluorescence naturelle. Elles présentent pour la plupart un aspect gommeux, brillant et translucide en relation avec l'excrétion de polysaccharides ou dites encore les exopolysaccharides (EPS). La taille de nos colonies est très variable (Tab.XII).

Les observations microscopiques réalisées sur des cellules vivantes non colorées à un grossissement de X40 ont montré que nos isolats sont mobiles. Ils se présentent généralement pour la plupart des isolats groupés en chainettes (Fig 8.a), seule l'isolat D4, les cellules sont groupées en grappe de raisin (Fig 8.b).

L'observation microscopique des cellules bactériennes a montré que tous des isolats possèdent des endospores non déformantes en position centrale (Fig 8.c), subterminale (Fig8.d) ou terminale (Fig 8.e) dans le corps bactérien.

L'ensemble de nos isolats ont été soumises à une coloration de Gram. Les 17 isolats ont présenté une coloration violette (Fig 8.f) et par conséquent ont été considérées comme des bactéries Gram positive (Cappuccino et Welsh, 2017).

L'ensemble de nos résultats et observations sont similaires avec celles décrites dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology et avec les travaux de Wafula et al., (2014);

Demirkan et al., (2014) et Mebarki et Benakli (2018) qui ont montré que les souches du genre Bacillus ont une forme de bacille, Gram positif et forment des spores non déformantes.

Tableau XII. Aspect macroscopique des isolats testés.

Isolats	Code	Forme	Contour	Regroupement	Couleur	Opacité	Taille	Consistance	Aspect
1	**A3**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Opaque	Grande	Crémeuse	Lisse
2	**A9**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Opaque	Grande	Crémeuse	Lisse
3	**A10**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Opaque	Grande	Crémeuse	Lisse
4	**A11**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Opaque	Petite	Crémeuse	Lisse
5	**B1**	Bacille	Ronde	Enchaine	Blanchâtre	Translucide	Moyenne	Crémeuse	Lisse
6	**B3**	Cocobacille	Ronde	Enchaine	Blanchâtre	Opaque	Moyenne	Crémeuse	Lisse
7	**B4**	Cocobacille	Ronde	Enchaine	Beige	Opaque	Petite	Crémeuse	Lisse
8	**B5**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Translucide	Grande	Crémeuse	Lisse
9	**B6**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Opaque	Grande	Crémeuse	Lisse
10	**B10**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Opaque	Moyenne	Crémeuse	Lisse
11	**B11**	Bacille	Ronde	Enchaine	Blanchâtre	Opaque	Grande	Crémeuse	Lisse
12	**C1**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Opaque	Petite	Crémeuse	Lisse
13	**C4**	Cocobacille	Ronde	Enchaine	Beige	Translucide	Moyenne	Crémeuse	Lisse
14	**D4**	Bacille	Ronde	Grappe de raisin	Beige	Translucide	Petite	Crémeuse	Lisse
15	**E1**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Translucide	Petite	Crémeuse	Lisse
16	**E4**	Bacille	Ronde	Enchaine	Blanchâtre	Translucide	Grande	Crémeuse	Lisse
17	**E5**	Bacille	Ronde	Enchaine	Beige	Opaque	Petite	Crémeuse	Lisse

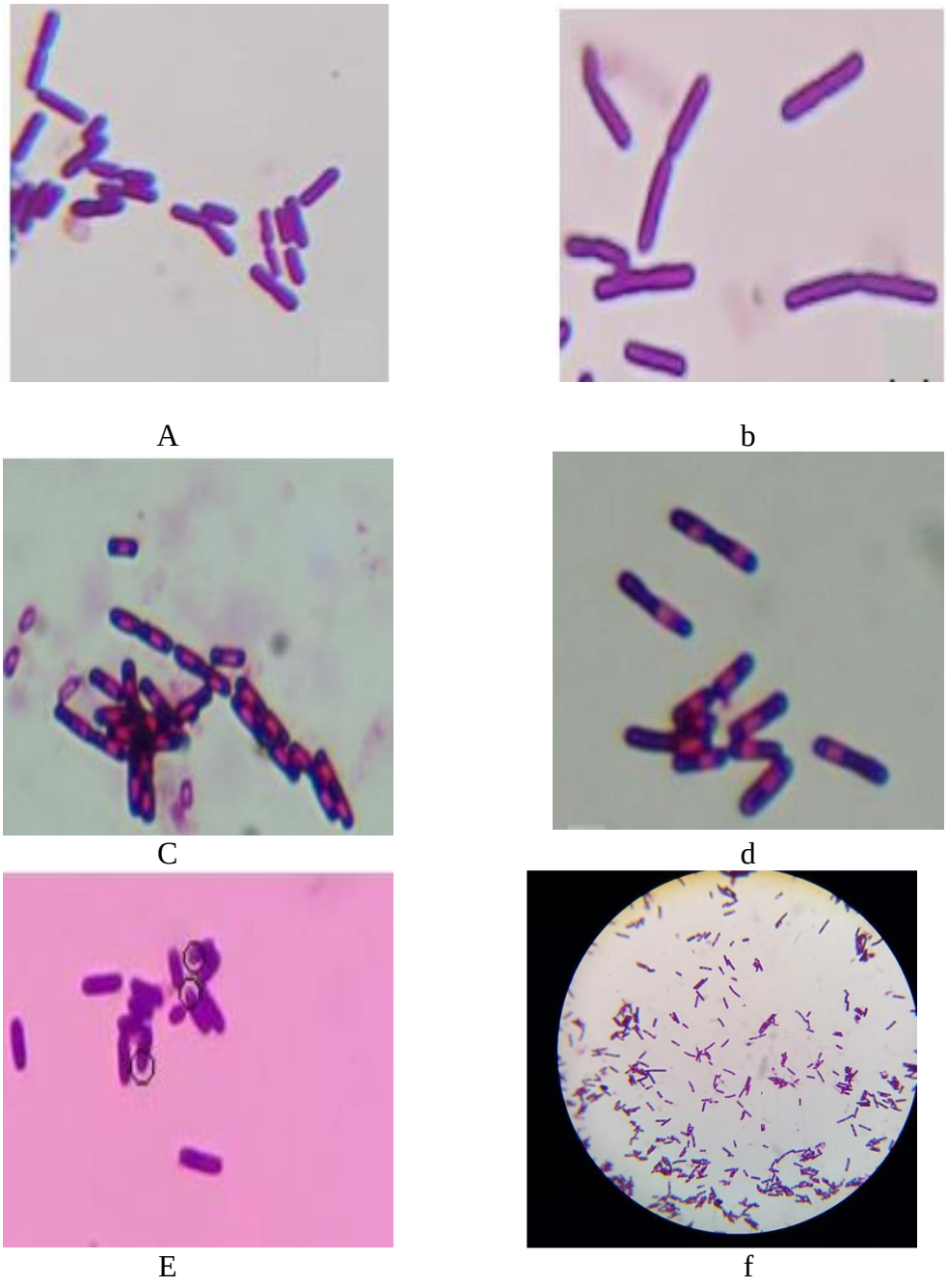


Figure 8. Aspect microscopique des isolats testés.

a. Mode de regroupement en chaine. b. Mode de regroupement en grappe de raisin. c .Endospore centrale. d. Endospore sub-terinale.e. Endospore terminale. f.Cellules de couleur violette.

4.2. Formation de Spore

La prolifération sur milieu TSA de nos isolats après un traitement thermique de 80°C pendant 60 min nous a permis de dire que l'ensemble de ces isolats sont considérés comme étant des thermorésistants. D'après Cazemier et al., (2001), la résistance aux fortes températures serait due à trois facteurs principaux, la déshydratation du protoplaste, la minéralisation et l'adaptation thermique. Les deux derniers facteurs induisant une augmentation de la déshydratation, c'est celle-ci qui serait à l'origine de la thermorésistance des spores (Sugiyama, 1951). La sporulation est une caractéristique principale des bactéries appartenant au genre Bacillus (Vinter, 1987).

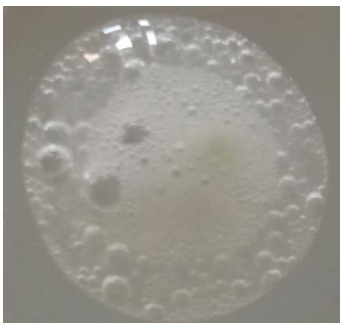
4.3. Caractérisation biochimique

4.3.1. Catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en dioxygène. Elle est considérée comme un moyen de survie dans les sols salins (Kim et al., 2005). Les résultats obtenus (Fig.9) montrent que la totalité de nos isolats sont révélées catalase positive donc la totalité de nos isolats sont des aéro-anérobies.



A



b

Figure 9. Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase.

a. Réaction catalase négative. b. Réaction catalase négative.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Bouras (2018),Rayavarapu et Padmavathi (2016), Azrou et Guettafi(2014) et Nawab et al (2016) qui ont constaté que les bactéries appartenant au genre Bacillus sont des catalase positive. En effet, l'enzyme catalase est considérée comme un moyen de protection des cellules contre le stress oxydative (Rayavarapuet Padmavathi ; 2016).

4.3.2.Oxydase

L'ensemble de nos isolats ont été testés pour l'oxydase. Le test oxydase permet de mettre en évidence la capacité d'une bactérie à produire le cytochrome oxydase, qui est une enzyme intervenant à la fin de la chaine respiratoire pour catalyser la fixation d'hydrogène et des électrons sur l'oxygène(Joffin et Leyral,2006).Ce test, standardisé pour l'identification bactériologique (Prescott, 2007)met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit.

Nos résultats ont montré que 10 isolats sont des oxydases positives. La réponse positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette à la surface des disques (Fig.10).



a b

Figure 10. Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase.

a : Disque oxydase avec une réaction négative. b : Disque oxydase avec une réaction positive

Le résultat obtenu avec le test oxydase confirme la nature aéro-anaérobie de nos isolats. En effet, le même résultat a été souligné par Azrou et Guettafi (2014) qui ont rapporté que certaines souches telles que *Bacillus sp* isolé à partir d'un sol agricole de la région d´Akbou (Bejaïa) ont été révélée positive pour la recherche de l'enzyme oxydase. Aussi, les travaux de Abdesselam et Latache (2017) ont trouvé que le bactéries appartenant au genre *Bacillus* isolé à partir de deux types de sols présentaient une oxydase positive.

Du même, les résultats de Bouras (2018) selon laquelle les Bacillus spp. isolées à partir du sol rhizosphérique de cinq sites différents: Ain Temouchent, Tessala, ITCMI, Sfisef et Kaied Belarbi révélées oxydase positive.

4.3.3. Mobilité

La détermination de la mobilité de nos isolats par observation microscopique des cellules à l'état frais a été renforcée par une mise en évidence sur le milieu de culture mannitol-mobilité. Les résultats obtenus (Fig.11) ont conformé la mobilité de toutes nos souches retenue pour cette étude. La mobilité a été traduite en changeant la couleur du milieu au jaune se réfère à la fermentation du mannitol par nos souches. Ces souches diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, en créant un trouble du milieu.

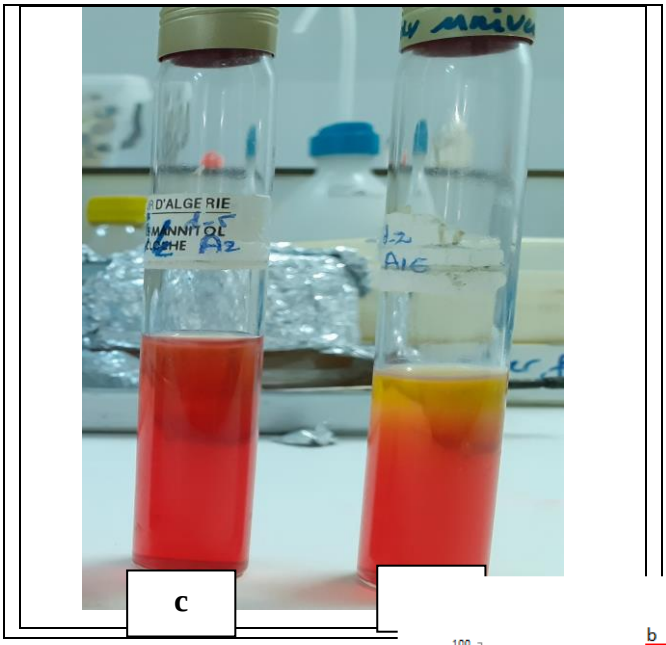
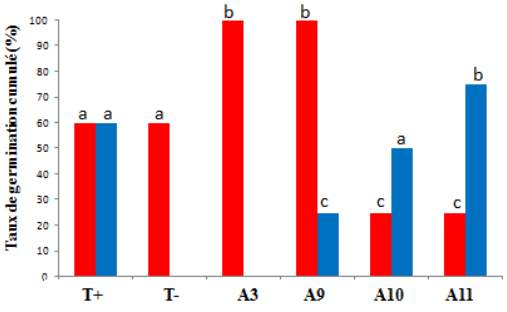


Figure.11 La mise en évidence sur le milie

c : test négative d: te



La capacité de biocontrôle des rhizobactéries testées long des racines. Des études ont été effectuées par N mobilité des rhizobactéries dans la rhizosphère flétrissement bactérien de la tomate causé par *Pseudomonas sulanacearum* ont montre que les*bacillus* étaient capables de réduire l'incidence de la maladie de manière significative mais l'échec des autres peut être dû en partie à l'incapacité des isolats testés à coloniser progressivement les racines ou la rhizosphère pendant la saison de croissance.la lutte

biologique doit dépendre de la capacité de suivre les racines au fur et à mesure de leur développement et d'établir des populations efficaces sur les racines ou dans la rhizosphère.

La mobilité dans la région racinaire peut également être importante en présence d'une irrigation intermittente. Alors que les isolats de rhizobactéries peuvent descendre sur les racines sur des distances considérables en percolant de l'eau (Liddell et Parke, 1989), seuls les isolats mobiles peuvent potentiellement se propager et coloniser les racines latérales formées entre les cycles d'irrigation (Misaghi et *al*., 1992).

4.3.4. Type respiratoire

Après une incubation de nos isolats pendant 4 jours au milieu VF, une croissance au niveau de tout le long du tube ensemencé par piqure central. Ces résultats impliquent que nos 17 isolats présentent un type respiratoire de type aéro-anaérobie facultative.

Cette capacité participe à la confirmation de l'affiliation a priori de ces isolats aux bactéries du genre Bacillus.

4.3. Caractérisation physiologique

La caractérisation physiologique de nos 17 isolats a porté sur l'étude du taux de croissance sous différentes températures d'incubation, pH et salinité (Tab XIII).

Tableau XIII. Taux de croissance des isolats sous différents conditions physiologique.

	Potentiel hydrogène			Température (°C)			Salinité (NaCl mM)			
Isolats	**PH=5**	**PH=7**	**PH=9**	**20C°**	**30C°**	**40C°**	**0mM**	**100mM**	**200mM**	**300mM**
A3	0,68±0,11	0,63±0,03	0,68±0,11	0,29±0,06	0,63±0,03	0,46±0,21	0,63±0,03	0,81±0,08	0,68±0,12	0,81±0,12
A9	0,62±0,13	0,44±0,00	0,62±0,13	0,39±0,05	0,44±0,00	0,44±0,07	0,44±0,00	1,03±0,5	0,59±0,13	0,85±0,01
A10	0,76±0,10	0,54±0,23	0,76±0,10	0,19±0,08	0,54±0,23	0,68±0,17	0,54±0,23	0,71±0,14	0,37±0,05	0,69±0,16
A11	0,55±0,32	0,48±0,14	0,55±0,32	0,472±0,18	0,48±0,14	0,71±0,19	0,48±0,14	0,44±0,14	0,53±0,14	0,79±0,05
B1	0,79±0,34	0,61±0,06	0,79±0,34	0,20±0,17	0,61±0,06	0,42±0,07	0,61±0,06	0,73±0,13	0,77±0,06	0,70±0,08
B3	0,63±0,20	0,50±0,05	0,63±0,20	0,47±0,02	0,50±0,05	0,53±0,17	0,50±0,05	0,78±0,25	0,80±0,03	0,653±0,06
B4	0,88±0,03	0,59±0,06	0,88±0,03	0,66±0,21	0,59±0,06	0,33±0,15	0,59±0,06	0,68±0,21	0,56±0,25	0,60±0,19
B5	0,41±0,07	0,24±0,00	0,41±0,07	0,71±0,07	0,24±0,00	0,51±0,04	0,24±0,00	0,42±0,04	0,33±0,07	0,28±0,02
B6	0,88±0,19	0,72±0,07	0,88±0,19	0,69±0,14	0,72±0,07	0,55±0,17	0,72±0,07	0,85±0,15	0,54±0,02	0,40±0,12
B10	0,75±0,20	0,64±0,03	0,75±0,20	0,92±0,11	0,64±0,03	0,48±0,14	0,64±0,03	0,60±0,05	0,61±0,30	0,62±0,22
B11	0,98±0,17	0,56±0,33	0,98±0,17	0,63±0,16	0,56±0,33	0,62±0,20	0,56±0,33	0,69±0,15	0,73±0,22	0,60±0,13
C1	0,79±0,28	0,80±0,03	0,79±0,28	0,88±0,04	0,80±0,03	0,50±0,06	0,80±0,03	0,61±0,17	0,61±0,10	0,67±0,14
C4	0,78±0,15	0,86±0,02	0,78±0,15	0,65±0,09	0,86±0,02	0,36±0,11	0,86±0,02	0,54±0,24	0,34±0,13	0,48±0,11
D4	1,00±0,12	0,73±0,19	1,00±0,12	0,70±0,21	0,73±0,19	0,41±0,11	0,73±0,19	0,89±0,09	0,81±0,21	0,98±0,08
E1	0,81±0,24	0,73±0,07	0,81±0,24	0,75±0,28	0,73±0,07	0,56±0,08	0,73±0,07	0,86±0,05	0,65±0,13	0,69±0,20
E4	0,91±0,16	1,00±0,09	0,91±0,16	0,70±0,05	1,00±0,09	0,46±0,36	1,00±0,09	0,90±0,12	0,42±0,09	0,81±0,09
E5	1,23±0,05	0,93±0,06	1,23±0,05	0,74±0,01	0,93±0,06	0,46±0,37	0,93±0,06	0,54±0,22	0,71±0,03	0,57±0,06

4.3.1. Température

La température a une importance majeure dans le métabolisme et la croissance des microorganismes (Berry et Foegeding, 1997). L'incubation de nos 17 isolats dans deux températures (20C°et 40 °C) nous a permis de constater que quel que soit la température d'incubation, les 17 isolats ont montré une croissance (Tabl.XIII). En effet, 10 isolats parmi les 17 isolats ont montré une légère diminution de croissance. Cette diminution de croissance est dûe au caractère thermophile des bactéries appartenant au genre Bacillus.

Les 7 isolats restants ont montré une augmentation de taux de croissance à 40°C en comparaison avec les taux donnés à 20°C. Les travaux de Praveen Kumar et *al* (2014) ont démontré que la plupart des souches de *Bacillus* spp. pouvaient tolérer les températures élevée (50°C), Cela pourrait être dû à leur capacité de former des endospores.

4.3.2. Potentiel hydrogène

Le pH est l'un des facteurs d'influence évidents de l'activité microbienne et des populations dans le sol (Woyessa et Assefa, 2011).

L'effet de la variation de la gamme de pH sur nos isolats a montré que tous nos isolats peuvent croître à pH acide (5), pH neutre (7) et pH alcalin (9).En effet, nos 17 isolats ont montré des taux de croissance relativement proche entre les trois valeurs de pH retenus pour cette étude (Tab.XI).

Cette capacité de croissance de nos isolats aux différents pH peut être expliquée par l'existence d'un bon potentiel de tolérance sur une plage de pH large. Cette particularité à été confirmé par les résultats des travaux de Lugtenberg et *al* (2013) sur la tolérance des espèces Bacillus spp et ce qui leur confère une adaptation aux différents types de sol.

4.3.3. Salinité

Afin de pouvoir tester la tolérance de nos isolats aux stress salin, nous avons provoqué la salinité par l'ajout de NaCl à différentes concentrations à savoir 100,200 et 300mM. La totalité des isolats testés ont montré une prolifération aux différentes concentrations de sel appliquées et cette prolifération a même été plus importante par rapport au témoin (sans ajout de NaCl).

La comparaison des taux de croissance des isolats B5 et B6 a montré qu'avec l'ajout de faible quantité de NaCl (100mM), la prolifération augmente puis diminue avec l'augmentation de la salinité. Les deux isolats peuvent être considérés comme étant des non halotolérantes.

Pour le reste des isolats, une légère diminution de la croissance a été observée à 200 mM puis elle augmente de nouveau à 300mM. Cette diminution puis augmentation de la croissance des isolats peut être expliquée par une phase d'adaptation aux conditions élevées de salinité. Les résultats que nous avons obtenus sont similaires aux travaux de Praveen Kumar et *al*., (2014) qui ont démontré que la plupart des isolats du genre *Bacillus* peuvent tolérer jusqu'à une concentration de 1.2M de NaCl, ces travaux attestent que ces bactéries semblent avoir une forte tolérance au sel.

4.4. Activité enzymatique

Le criblage de l'activité enzymatique de nos isolats a été effectué pour six enzymes à intérêt biotechnologique et qui a été réalisé sur des milieux de culture solide, il s'agit de : Amylase, Protéase, Cellulase, Uréase, Gélatinase et Lipase (Tab.XIV).

5.4.1. Amylase

L'amidon est un polymère de glucose qui constitue le glucide principal des graines, son hydrolyse est catalysée par l'amylase qui fournit le glucose, le maltose et les dextrines. Les amylases sont parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes.

Le criblage de l'activité amylolytique de nos isolats sur milieu solide additionné d'amidon a montré que la totalité de nos isolats, à l'exception de l'isolat E1, possèdent une activité amylase positive (Tabl.XIII). Cette activité positive a été traduite par l'apparition d'un halo claire autour de la colonie après un traitement avec une solution de lugol (Fig.12).

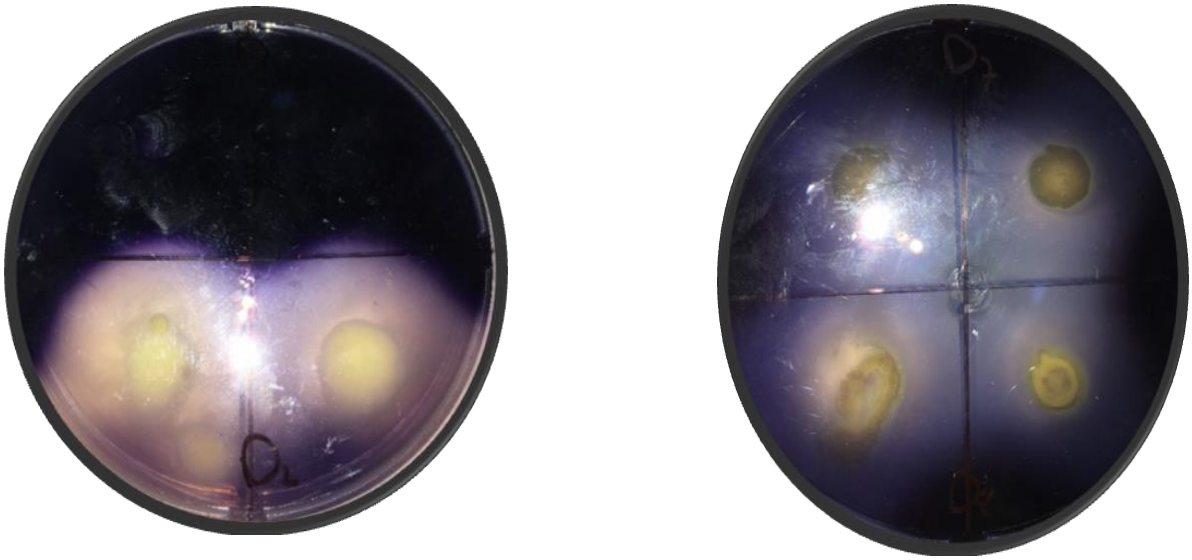


Figure 12. Mise en évidence de l'enzyme amylase.

Le diamètre de l'halo autour de la colonie indique l'intensité de l'activité de l'enzyme.Nous avons trouvé 9 isolats qui ont montré un diamètre qui varie entre 28 mm et 45mm. Ces isolats ont été considéré comme des isolats à forte production d'amylase, il s'agit des isolats A3. A9. A11. B1. B3. B6.B10. B11. D4.

Le deuxième groupe a été représenté par 5 isolats, à savoir A10. C1. C4. E4 et E5. Pour ce groupe le diamètre de l'halo est de 16 à 28 mm, de ce fait sont considérés comme des isolats a une production amylolytique modérée. Le troisième grouperenferme deux isolats (B4 et B5) a faible production d'amylase car ils présentent un diamètre de l'halode 8 mm et de 16 mm respectivement pour les isolats.

D'après Obi et Odibo (1984) dans leur étude sur *Bacillus sp*, une production de quantités considérables en α-amylases. La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature en fournissant des éléments minéraux que les plantes exigent pour leur croissance.

Tableau XIV. Activité enzymatique des isolats testés

Les diamètres de l'halo est donnée en mm.

Test D'Enzymes	Amylase		Gélatinase	Protéase	Lipase		Uréase		Cellulase	
Isolats	Formation d'halo	Diamètre de l'halo	Formation d'halo	Formation d'halo	Formation d'halo	Diamètre de l'halo	Formation d'halo	Diamètre de l'halo	Formation d'halo	Diamètre de l'halo
A3	+	34±0	-	-	+	13,33±0,57	+	6,66 ±0,47	+	12±20,78
A9	+	36,33±6,94	-	-	+	4±6,98	+	2,33±3,29	+	14,66±12,85
A10	+	24,66±3,39		-	+	13,66±1,52	+	5±3,55	+	21,66±152
A11	+	31,33±2,49	-	-	+	13,33±1,52	-	/	+	22±19,97
B1	+	31,33±1,24	-	-	+	14±1	+	6,66±1,88	+	20,33±4,50
B3	+	34±1,63	-	-	+	14,66±1,54	+	6,33±0,49	+	18,33±31,75
B4	+	11,33±3,39	-	-	+	15,33±2,30	+	6±0,81	+	9,33±16,16
B5	+	15±5,71	-	-	+	6,33±0,57	+	8±5,71	-	/
B6	+	31,33±0,94	-	-	+	13,33±1,15	+	10±2,16	+	16±13,89
B10	+	30,66±4,10	-	-	+	12±1,72	+	9,33±0,47	+	24,66±13,65
B11	+	35±7,25	-	-	+	8,33±1,52	+	6,33±0,47	+	32,66±7,05
C1	+	18,33±6,18	-	-	+	12±1,73	+	7,66±0,47	+	33±0
C4	+	27,33±0,94	-	-	+	9,66±8,38	+	7,33±0,47	+	9,33±8,14
D4	+	38±2,16	-	-	+	12,66±1,52	+	7±0	-	/
E1	-	/	-	-	+	12,66±0,57	+	8,66±0,47	+	5,33±9,23
E4	+	17,33±4,02	-	-	+	12±1	+	7,66±0,47	+	6±5,91
E5	+	24±0,81	-	-	+	11±0	-	/	+	24±3,46

5.4.2. Gélatinase

Le test d'hydrolyse de la gélatine est utilisé pour détecter la capacité d'un organisme à produire de la gélatinase (enzyme protéolytique) liquéfiant la gélatine. Dans la première réaction, les gélatinases dégradent la gélatine en polypeptides. Ensuite, les polypeptides sont convertis en acides aminés. Les cellules bactériennes peuvent ensuite absorber ces acides aminés et les utiliser dans leurs processus métaboliques.

Nos résultats ont montré que l'ensemble des isolats ont montré une incapacité de dégrader la gélatine. Ces résultats contrastent avec les travaux de Shanmugasundaram (2012) qui ont monté que les isolats de *Bacillus spp* ont une forte activité gélatinase importante (2,1 $U.mL^{-1}$).

5.4.3.Protéase

Les protéases d'origine microbienne sont parmi les enzymes les plus secrétées et utilisés en biotechnologie (Ningthoujam et *al*., 2009). Les souches protéolytiques sont reconnues par la formation des halos translucides au tour des colonies. La formation de la zone claire autour de la colonie indique sa capacité à hydrolyser de la caséine (Protéine du lait).

L'ensemble des 17 isolats testés ont montré une activité négative. L'incapacité de nos isolats à hydrolyser les protéines n'est pas en accord avec les résultats obtenus par Fabiano et *al*., (2017) qui ont constaté que le genre *Bacillus* est probablement la source bactérienne la plus importante de protéases. Cette perte d'activité peut être due à une modification génétique ou une adaptation aux conditions du milieu.

5.4.4.Lipase

La production de lipases est influencée par la nature et la disponibilité de la source de carbone et d'azote. Les lipases peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides et leurs substrats préférentiels qui sont les acides gras et le glycérol (Guzmán et al., 2008). Elles sont largement répandues chez les bactéries à Gram positif (Fickers et *al.*, 2008).

L'observation à l'oïl nu de la formation d'un halo opaque autour des colonies ensemencé à la surface du milieu de culture indique la formation de cristaux de sel de calcium.(Fig.13).

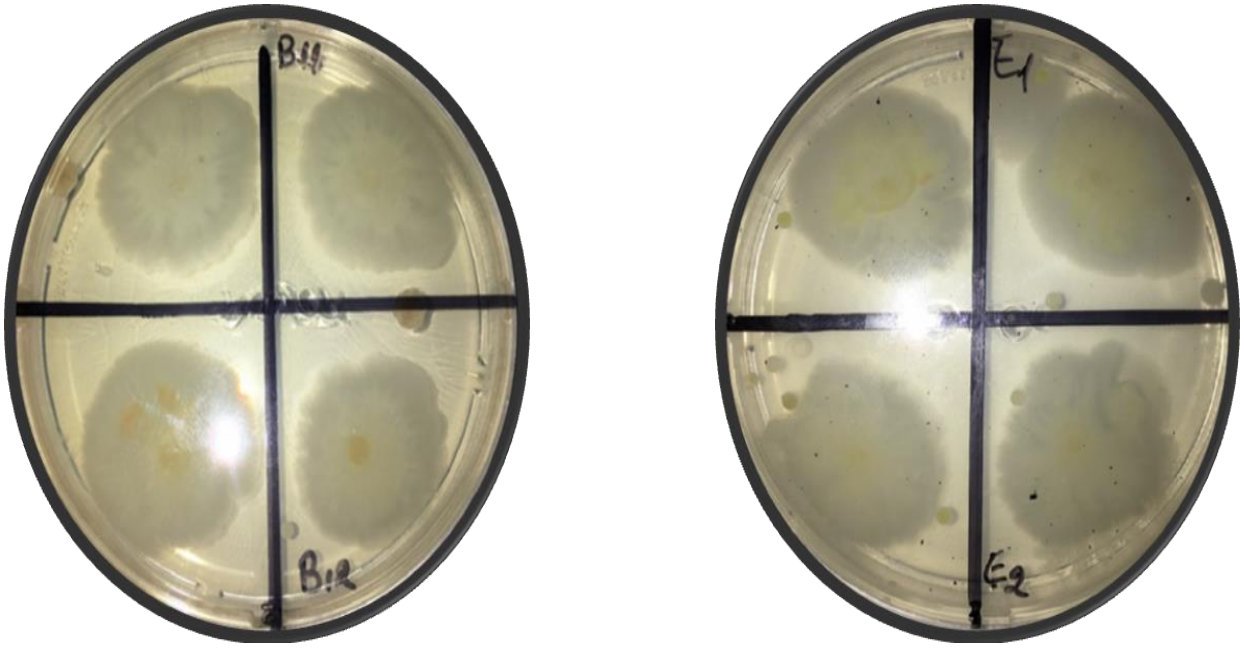


Figure 13. Mise en évidence de l'enzyme lipase.

Les résultats obtenus ont montré que nos 17 isolats ont la capacité de dégrader la source lipidique additionnée au milieu de culture dont 14 isolats ont pu développer des diamètres supérieur à 10 mm avec la plus forte production chez l'isolat B4 avec un diamètre de 15,33±2,30mm.

Nos résultats sont similaires avec les travaux de Azrou et Guettafi (2014) qui ont démontré que la plupart des souches de *Bacillus* isolées à partir d'un sol agricole de la région d'Akbou (wilaya de Bejaïa) peuvent produisent des lipases.

5.4.5.Uréase

L'enzyme uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et carbamate, qui est alors spontanément hydrolysé pour former une molécule d'acide carbonique ainsi qu'une seconde molécule d'ammoniac. L'acide carbonique se dissocie à pH physiologique, et les molécules d'ammoniac s'équilibrent alors avec l'eau pour être protonées, Il en résulte une nette augmentation du pH. Elle est utilisée comme indicateur de la qualité du sol car sa concentration est fonction du taux de la matière organique (Martinez-Salgado et *al*., 2010).

La production d'uréase se manifeste par l'apparition de la couleur rouge suite à l'alcalinisation du milieu. La recherche de l'activité uréase chez nos isolats a montré que 88% de nos isolats sont positifs (Fig.15). Le calcul du diamètre du halo de dégradation nous a permis de constater que Nos isolats à une production faible à modérée avec un diamètre d'halo de 2mm et 10mm.

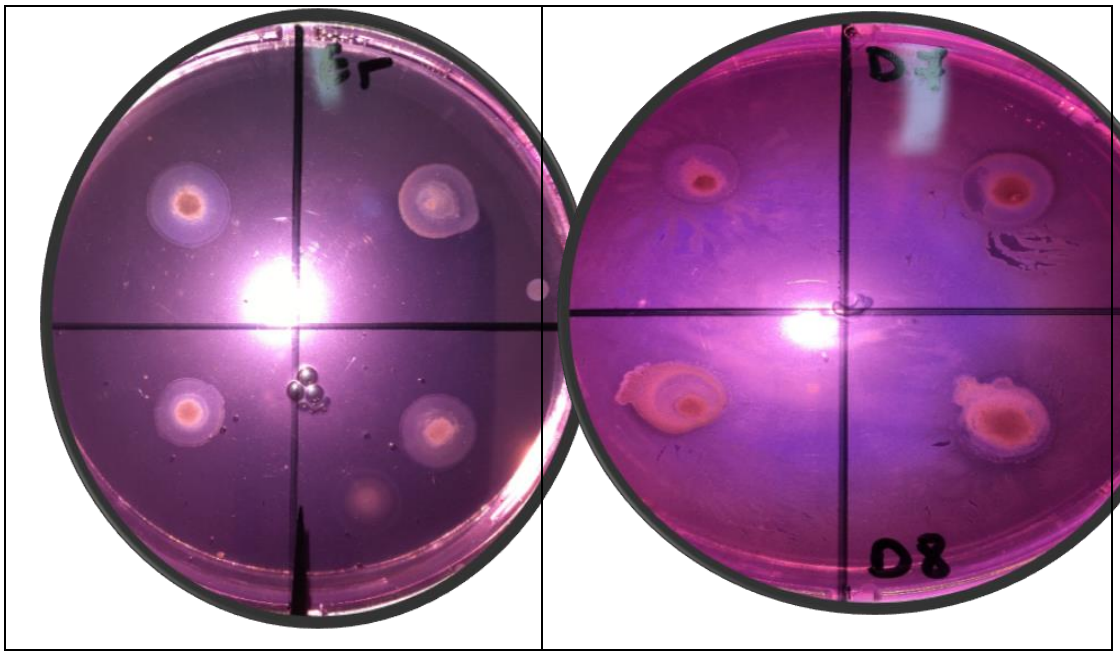


Figure 14. Mise en évidence de l'enzyme Uréase.

Selon Mobley et al ont montré que L'activité uréasique du sol a grande importance car elle module l'absorption d'azote par les plantes après l'application d'urée comme fertilisant (Mobley et al., 1995). En effet L'enzyme uréase est un candidat idéal qui peut être largement utilisé pour explorer les changements dans la fertilité du sol, car l'activité uréase augmente avec l'utilisation d'engrais organiques et diminue avec le travail du sol (Saviozzi et al., 2001). L'activité de l'uréase microbienne diminue également la toxicité des métaux lourds, l'uréase microbienne étant considérée comme un moyen de lutte contre la pollution (Yang et al., 2006).

5.4.6. Cellulase

Environ la moitié de carbone est fixée sous forme de cellulose, ce qui fait de la cellulose le composé organique le plus abondant sur Terre (Béguin et Aubert, 1992). Malgré sa faible densité, la cellulose est le matériau organique naturel le plus résistant et le plus stable connu à ce jour. De par sa nature physico-chimique (Bayer et Lamed, 1992), la dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle du carbone (Béguin et Aubert, 1994). Elle est essentiellement convertie par les microorganismes en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies et en méthane en anaérobiose (Ljungdahl et Eriksson, 1985).

Dans cette étude l'hydrolyse de cellulose se manifeste par la dégradation de CMC (Carboxy-methyl-cellulose) qui est le composant fondamental de la paroi végétale, traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie après un traitement avec une solution aqueuse de rouge Congo (1%) .

88% de nos isolats ont montré la capacité de dégradé le CMC (Fig.16).Les colonies apparaissent entourées d'une zone claire avec différents diamètres selon les isolats. Le lugol interagit rapidement avec la cellulose native, il forme un complexe marron foncé mais pas avec la cellulose hydrolysée. Ceci révèle une zone distincte (halo) de couleur claire autour des colonies productrices de cellulases, qui correspond à la zone d'hydrolyse de la cellulose (Yeoh et al., 1985).(on été utilisé le rouge Congo)



Figure 15. Mise en évidence de l'enzyme Cellulase.

D’après Maki et *al.* (2011), Plusieurs souches de *Bacillus* produisent les cellulases à 70%. Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec ceux obtenus par Lu et *al*. (2005), ont montré que les espèces de *Bacillus* jouent un rôle important dans la biodégradation et la bioconversion des composés de haut poids moléculaires. Les espèces : Bacillus subtilis et Bacillus licheniformis sont fréquemment signalées parmi les espèces cellulolytiques.

le diamètre d’halo et celui de la colonie est proportionnel à la quantité de cellulases extracellulaires secrétées par les bactéries et permet de classer nos isolats à forte, modérée et faible production (Tab.XV).

Nos résultats nous a permis de classé nos isolats en deux groupes forte production de 24mm à 55mm et moderé production de diamétre de 9 mm à 24.

Le test de screening solide est assez sensible pour un screening primaire des microorganismes cellulolytiques, mais la taille de la zone d’hydrolyse n’est pas toujours significative de l'activité cellulasique. Une étude a montré que, parmi 77 isolats microbiens cultivés sur milieu CMC, l’isolat à activité enzymatique la plus élevée était celui qui présente la zone claire la moins large (Bettache, 2013).

4.5. Caractérisation coloniale

4.5.1. Formation de biofilm

Les biofilms sont des communautés microbiennes uni ou multi adhérentes aux surfaces biotiques ou abiotiques et / ou en contact intime l'une avec l'autre, enfermées dans une matrice auto-produite de substances polymères extracellulaires (EPS). Les biofilms rhizosphériques sont des biofilms positifs par opposition aux biofilms négatifs qui sont à l’origine des problèmes de contaminations microbiennes. La production de biofilm par les PGPR reflète leur pouvoir de colonisation du système racinaire est considéré comme une activité PGP importante (Prescott et *al*., 2003)

Dans cette étude, Nous avons étudié la capacité de nos isolats à former des biofilm par la méthode de Gélose Rouge Congo (Méthode qualitative) décrite par Freeman et *al.* (1989) utilisés dans les laboratoires de routine.

Les résultats obtenus ont montré que parmi nos17isolats, 9 isolats soit 52.94% sont formatrice de biofilm sur le milieu rouge Congo ((Tabl.XV).

Tableau XV: Mise en évidence de formation de biofilm par les souches de Bacillus.sp par la méthode Rouge Congo (RCA).

ID	Couleurs	Phénotypes
A3	Rouge	Négative (-)
A9	Noire	Positive (+)
A10	Noire	Positive (+)
A11	Noire	Positive (+)
B1	Rouge	Négative(-)
B3	Rouge	Négative(-)
B4	Noire	Positive (+)
B5	Noire	Positive (+)
B6	Noire	Positive (+)
B10	Rouge	Négative (-)
B11	Rouge	Négative (-)
C1	Rouge	Négative (-)
C4	Noire	Positive (+)
D4	Rouge	Négative (-)
E1	Rouge	Négative (-)
E4	Noire	Positive (+)
E5	Noire	Positive (+)

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Timmusk et al (2013) qui ont rapporté que les rhizobactéries ont la capacité de former des biofilm en sécrétant des polysaccharides et des protéines, la matrice ainsi formée limite la diffusion de composés tels que les hormones de croissance végétale et les nutriments du voisinage de la plante , favorisant ainsi la croissance des plantes en atténuant les condition de stress. Aussi, Les biofilms formés par le PGPR autour des racines sont constitués de populations bactériennes ou de communautés bactériennes encapsulées dans la matrice extracellulaire polymérique formée par les bactéries elles-mêmes, elles ont adhéré aux surfaces externes suffisamment humides (Hafsa N et al 2018)

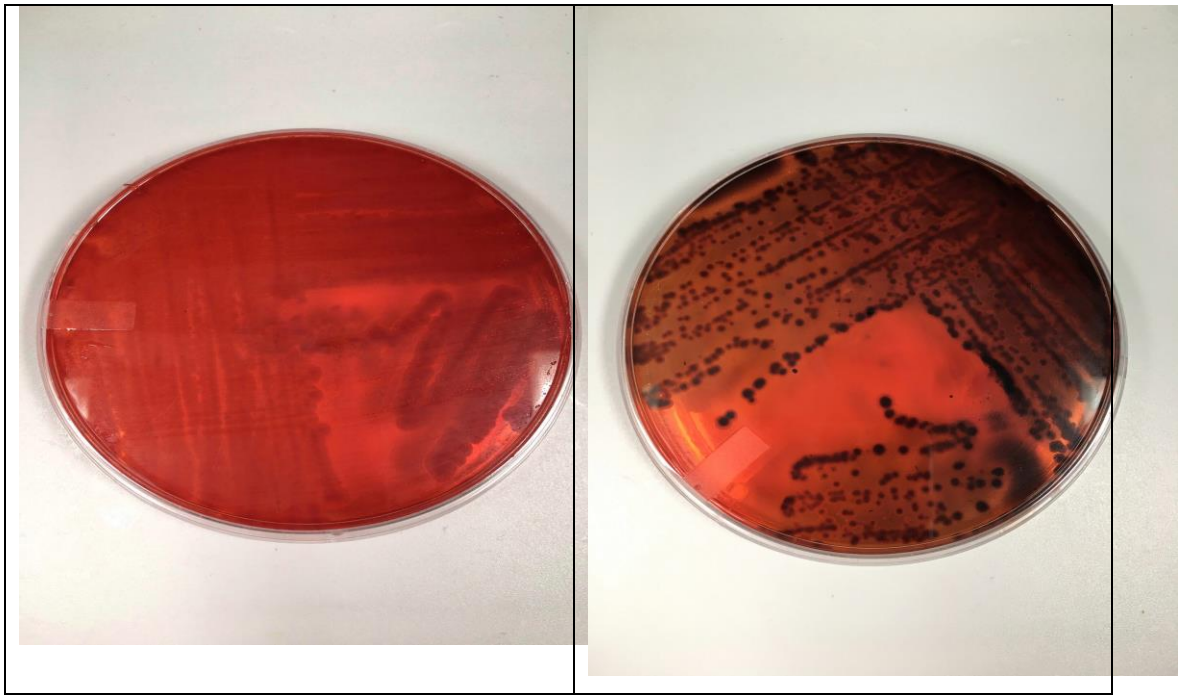


Fig 16: Résultats de formation de biofilm par les souches de *Bacillus.sp* par la méthode Rouge Congo(RCA).

4.5.2. Test d'agglutination

Le test d'agglutination a été utilisé afin d'estimer l'hydrophobicité des isolats (Tabl.XIV). L'ensemble de nos isolats ont montré une réaction négative avec la solution de sulfate d'ammonium à 0.25M et 0.5M. Seulement 4 isolats (B1, B5, C1 et C4) ont formé un précipité avec la solution de sulfate d'ammonium à 1M. Selon Balebona et al (2011), les isolats qui ont la capacité de former un précipité avec une solution de sulfate d'ammonium entre 0.1 et 1M sont considérés comme hydrophobes.

Avec des solutions de sulfate d'ammonium de 1.5M, 2M et 2.5M, 11, 15 et 16 isolats respectivement, ont formé un précipité avec la solution de sulfate d'ammonium. Selon Balebona et al (2011), les isolats qui ont la capacité de former un précipité avec une solution de sulfate d'ammonium supérieur à 1M sont considérés comme hydrophiles.

L'étude de Brisset et al (1996) a montré que les bactéries les plus hydrophobes sont les plus capables à coloniser les matières hydrophobes. Bien que le phénomène d'adhésion ne peut pas être traité seulement avec l'hydrophobicité mais en prenant en compte d'autre paramètres tel que les caractères acide-base et la charge globale de la cellule bactérienne.

Ces deux paramètres constituent les principaux facteurs contrôlant l'adhérence initiale (Colonisation des surfaces). Ces propriétés sont eux même sensibles aux conditions physico-chimiques du milieu de suspension (Boutaleb, 2007).

Tableau XVI: Réaction des isolats avec le sulfate d'ammonium.

0,25M.0, 5M.1M.1, 5M,2M et 2,5M. Les différentes concentrations des solutions de sulfate d'ammonium. Pos. Formation de précipité. nég. Absence de précipité. Les observations données est suite à trois répétitions.

Code isolats	0,25M	0,5 M	1M	1,5M	2M	2,5M
A3	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A9	neg	neg	neg	neg	neg	pos
A10	neg	neg	neg	pos	pos	pos
A11	neg	neg	neg	pos	pos	pos
B1	neg	neg	pos	pos	pos	pos
B3	neg	neg	neg	pos	pos	pos
B4	neg	neg	neg	pos	pos	pos
B5	neg	neg	pos	pos	pos	pos
B6	neg	neg	neg	pos	pos	pos
B10	neg	neg	neg	pos	pos	pos
B11	neg	neg	neg	neg	pos	pos
C1	neg	neg	pos	neg	pos	pos
C4	neg	neg	pos	pos	pos	pos
D4	neg	neg	neg	pos	pos	pos
E1	neg	neg	neg	neg	pos	pos
E4	neg	neg	neg	neg	pos	Pos
E5	neg	neg	neg	pos	pos	Pos

Conclusion

Le rejet de déchets non traités de différentes industries a de graves effets néfastes sur l'environnement. La pollution avec les colorants des eaux et sols constitue une menace à l'environnement, d'où la nécessité de traiter cette pollution par le choix et l'application d'un procédé adapté aux différents conditions.
Les bactéries sont l'une des nouvelles alternatives exploitées pour le traitement des eaux usées à différents colorant synthétiques pour une élimination sûre dans l'environnement. Ces bactéries sont largement distribuées dans l'écosystème et peuvent fonctionner dans un large éventail de conditions environnementales, ils peuvent avoir une meilleure survie grâce à la présence de différents mécanismes d'adaptation (Khalid et Mahmood, 2015).

Notre étude a été portée sur 53 isolats bactériens originaires du sol rhizosphérique des plantules d'orge commun cultivée dans la région aride d'El Ménéa et qui ont été testé pour leur capacité à dégrader deux colorants : le bleu de méthylène et le rouge congo.

Sur les 53 isolats testés, 20 isolats ont été capable à dégrader le bleu méhylène à des taux supérieur à 25% et qui arrient à 71% au quatrième jour de suivi. 17 isolats ont montré des taux de biodégrdation de 80% après une journée d'incubation et qui atteint 86% au bout de cinquième jours. Nos 17 isolats ont montré une grande capacité à dégrader les deux colorants mais avec un meilleur rendement pour le rouge congo.

L'optimisation de la dégradation des deux colorants a été effectuée en changeant un ensemble de facteurs. La température et le pH ont montré un effet positif sur la biodégradation des deux colorants, alors que l'ensemble des facteurs ont améliorer cette capacité avec le RC seulement.

Les deux colorants ont montré une phytoxicité qui a été traduite par une diminution des taux de germination cumulés des graines de lentilles et l'utilisation des bactéries comme inoculum a non seulement supprimé cet effet, il a amélioré ce taux de germination à 100%. Un résultat encore plus intéressant que les témoins.

La caractérisation phénotypique des 17 isolats en se basant sur la coloration de Gram, la visualisation des endospores et la croissance des colonies après le traitement thermique et un ensemble de tests basant sur leurs caractères culturaux et biochimiques, nous a permis de s'assurer que notre sélection d'isolats appartient au genre Bacillus.

A l’issue de ce travail, plusieurs perspectives et recommandations semblent nécessaires à réaliser :

- Réalisation une étude plus profonde avec le rouge congo
- Réalisation d’une application à l’échelle industrielle.
- Identification des métabolites de biodégradation par HPLC.SM et FTIR.

Références bibliographiques

A

Abdesselam et Latache ,2017. Identification et caractérisation des bactéries isolées à partir de différents sols, Diplôme de Master En Biologie Option Microbiologie, Université de Tlemcen. p.18.

Adlercreutz et al.,1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. Annals of medicine, 29(2), 95-120.

Antoun et al.,1998. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (Raphanus sativus L.). *Molecular microbial ecology of the soil*. Springer, Dordrecht, 57-67.

Anyia et al.,2009. Plant growth-promoting diazotrophs and productivity of wheat on the Canadian prairies. In Microbial strategies for crop improvement (pp. 287-300). Springer, Berlin, Heidelberg.

Amarger, 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate Phaseolus vulgaris in Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology*, *41*(1), 77-84.

Azrou et Guettafi 2014 . Recherche de caractères d'intérêt agricole chez certaines bactéries rhizosphèriques, Université Abderrahmane Mira de Bejaia, P23.

B

Bahloul.2007. Extraction par membrane liquide émulsionnéedes colorants cationiques bleu de méthylène etméthyl violet en phase aqueuse. Diss. Université Badji Mokhtar de Annaba.

Balebona et al ,2001. Hydrophobicity and adhesion to fish cells and mucus of Vibrio strains isolated from infected fish. *International Microbiology*, *4*(1), 21-26.

Bandara et al., 1999. Photoassisted Fenton degradation of nonbiodegradable azo dye (OrangeII)in Fe-free solutions mediated by cation transfermembranes. *Langmuir*, *15*(1), 185-192.

Bais et al., 2006 . The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms.Annual review of plant biology 57.1 :233-266.

Barbier et al., 2012 . *Manuel de sociologie de l'environnement*. Presses de l'Université Laval,

Barea et al. 2002b. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van leeuwenhoek*, *81*(1), 343-351.

Barclay et Buckley , 2000. "Waste minimization guide for the textile industry." *A step towards cleaner production* 1 .

Bashan et de-Bashan, 2005. Plant growth-promoting. In D. Hillel (dir.), Encyclopedia

of Soils in the Environment (vol 1, p. 103-115). Elsevier,Oxford, U.K.

Bashan et al. 2008. Comparison of detrending methods for fluctuation analysis. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications, 387(21), 5080-5090.

Basson et al ., 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, *456*(7224), 980-984.

Bauer et al.,2001..Protein translocon at the Arabidopsis outer chloroplast membrane. Biochemistry and Cell Biology, 79(5), 629-635.

Bayer et Lamed, 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource. *Biodegradation*, *3*(2), 171-188.

Béguin et Aubert, 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS microbiology reviews*, *13*(1), 25-58.

Begon et al,1996. Backscattered electron scanning images of soil porosity for analyzing soil compaction around roots. Soil Science Society of America Journal, 60(3), 895-901.

Beisson et al., 2001. Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. *Biochimica* et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1531(1-2), 47-58.

Ben mansour et al., 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.

Beniziri et al., 2001. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. European Journal of Soil Biology 37.2 :85-93.

Berry et Foegeding, 1997. Cold Temperature Adaptation and Growth of Microorganisms. Journal of Food Protection, 60(12), 1583–1594.

Bettache, 2013. Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria. Innovative Romanian Food Biotechnology, (13), 80-88.

Binupriya et al. 2010. Biosorption of Procion Red MX 5B by Bacillus subtilis and its extracellular polysaccharide: effect of immobilization." CLEAN–Soil, Air, Water 38.8 (2010): 775-780.

Blumer et Haas, 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Archives of Microbiology, 173(3), 170-177.

Borneman et al., 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 62.6 .1935-1943.

Borneman et Triplett, 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation." *Applied and environmental microbiology* 63.7:2647-2653.

Bouherama et al.2021. Diversité des rhizobia associés au genre Hippocrepis en Algérie. Botany, 99(10), 639-650.

Bouras, 2018. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans. International Journal of Hyperthermia, 34(8), 316-1328.

Bousseboua, 2002. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de la protease acide par Aspergillus niger. Sciences & Technologie. C, Biotechnologies, 59-63.

Boutaleb, 2007. Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Diss. Lorient.

Bouzid, 2017. Étude ethnobotanique de la plante médicinale Arbutus unedo L. dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale. Phytothérapie, 15(6), 373-378.

C

Carrim et al., 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of Jacaranda decurrens Cham.(Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *49*, 353-359.

Cappuccino et Welsh, 2017. Microbiology: a laboratory manual. Pearson Education.

Cazemier et al., 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. Journal of Applied Microbiology, 90(5), 761-770.

Clarke et Anliker,1980. Organic dyes and pigments. Anthropogenic compounds. Springer, Berlin, Heidelberg, 181-215.

Cohen et al.,2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic Azospirillum in thealleviation of drought effects in maize. Botany. 87(5): 455-462

Colinlafleur, 2008. Évaluation d'un procédé de coagulation-floculation au chitosane pour l'enlèvement du phosphore dans les effluents piscicoles.Rapport commandité par la SODIM (Société de développement de l'industrie maricole inc) : 80-84.

Christensen, 1946. Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. Journal of bacteriology, 52(4), 461-466.

Chengalroyen,2011. Studies on triphenylmethane, azo dye and latex rubber biodegradation by actinomycetes (Doctoral dissertation, University of the Witwatersrand).

Chimezie et Thomas, 2011. Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triarylmethane dyes by Aeromonas hydrophila isolated from industrial effluent. *Biotechnology research international* .

D

Delarras,2014. Pratique et microbiologie de laboratoire. Recherches de bacteries et de levures - moisissures.(Ed).Céline,poiteux- Paris;772 p.

De Reguardati S., Barthe W. 2012. Les colorants organiques utilisés en teinturerie : aspects physico-chimiques. Museum national d'histoire naturelle,1-13.

E

Eckenfelder, 1992. Wastewater (Part 2): A guide to industrial pretreatment. Chemical Engineering 99.6 :78.

Elad et Kapat,1999. The role of Trichoderma harzianum protease in the biocontrol of Botrytis cinerea. *European Journal of plant pathology*, *105*(2), 177-189.

F

Fabiano et al., (2017).

Faugier,2010. Diversité bactérienne des sols: accès aux populations à effectifs minoritaires" the rare biosphere". Diss. Ecole Centrale de Lyon.

Frey-Klett et al.,2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. New phytologist 165.1 :317-328.

Fickers et al., 2008. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. Biotechnologie, agronomie, société et environnement 12.2.

G

Gobat et al., 2004. *The living soil: fundamentals of soil science and soil biology*. Science Publishers.

Govindan et al., 2016. Alectinib in crizotinib-refractory ALK-rearranged non-small-cell lung cancer: a phase II global study. *Journal of clinical oncology*, *34*(7), 661-668.

Greene et Baughman,1996. Effects of 46 dyes on population growth of freshwater green alga Se/eksfrum capricornutum.Text. Chem. Color 28.4 :23-30.

Griffiths,1984.On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. Journal of ultrastructure research 89.1: 65-78.

Guzmán et al., 2008. Lipolytic enzyme production by halophilic/halotolerant microorganisms isolated from lagunaverde, bolivia. Centro de Biotecnología − UMSS, Cochabmamba - Bolivia ; Laboratoire de Chimie Biologique − Université Libre de Bruxelles, Belgium. 25(1)

H

Hafsa N et al . , 2018. Rapid and reliable protein structure determination via chemical shift threading. Journal of Biomolecular NMR, 70(1), 33-51.

Hammami, 2008. Étude de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée. Application à la dépollution des rejets industriels (Doctoral dissertation, Université de Marne la Vallée).

Harshad et al.,2015. Bilateral ovarian primary Burkitt's lymphoma in a child: A clinico-radio-pathological evaluation. Medical Journal of Dr. DY Patil University, 8(2), 223.

Hassink , 1993. Relationships between soil texture, physical protection of organic matter, soil biota, and C and N mineralization in grassland soils. In *Soil Structure/Soil Biota Interrelationships* (pp. 105-128). Elsevier.

Hsueh et Chen, 2007. Highly sensitive ZnO nanowire ethanol sensor with Pd adsorption. Applied Physics Letters 91.5 :053111.

I

Iribar, 2007. Composition des communautés bactériennes dénitrifiantes au sein d'un aquifère alluvial et facteurs contrôlant leur structuration: relation entre structure des communautés et dénitrification (Doctoral dissertation, Toulouse 3).

J

Jadhav et al.,2008. Kinetics and Mechanism of Reactive Red 141 Degradation by a Bacterial Isolate Rhizobium radiobacter MTCC 8161. Acta Chimica Slovenica, 55(2).

Jinqi, Liu, and Liu Houtian.,1992. Degradation of azo dyes by algae.*Environmental pollution* 75.3 : 273-278.

Joffin et Leyral 2006.Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. 1 ere Edition. Bordeaux. p248.

Jossi, 2008. Spatio-temporal dynamics of bacterial communities associated with two plant species differing in organic acid secretion: a one-year microcosm study on lupin and wheat. Soil Biology and Biochemistry, 40(7), 1772-1780.

K

Khadhraoui et al.,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.

Kifuani et al.,2018. Adsorption d'un colorant basique, Bleu de Méthylène, en solution aqueuse, sur un bioadsorbant issu de déchets agricoles de Cucumeropsis mannii Naudin. International Journal of Biological and Chemical Sciences 12.1 :558-575.

Killian et Fehèr, 1939. Recherches sur la microbiologie des sols désertiques: résultats des missions sahariennes Killian-Fehér. No. 576.190954.

Kim et al., 2005. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. Journal of ethnopharmacology, 100(1-2), 53-56.

Kumar et al., 2016 . Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016. Eurosurveillance, 21(27), 30280.

L

Laurent et al., 2010. Simulation de la Perception des couleurs de colorants organiques. Techniques de l'Ingénieur, AF 6810, pp ,3-4

Lemonnier, 2002. Les textiles et leur entretien». Editions Jacques Lanore, Paris 7e, ,p 104-105.

Liddell et Parke, 1989. Enhanced colonization of pea taproots by a fluorescent pseudomonad biocontrol agent by water infiltration into soil. Phytopathology, 79(12), 1327-1332.

Ljungdahl et Eriksson, 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. In Advances in microbial ecology (pp. 237-299). Springer, Boston, MA.

Lu et al.,2005. Isolation and characterization of chitinases from Verticillium lecanii. Canadian journal of microbiology, 51(12), 1045-1055.

Lugtenbergetal et al. ;2002. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. Antonie Van Leeuwenhoek, 81(1), 373-383.

Lynch et Whipps , 1990. Comparison of biomass and viable propagule measurements in the antagonism of Trichoderma harzianum against Pythium ultimum."Soil Biology and Biochemistry 22.2 : 187-194.

M

Maba,2014. Les champignons sauvages comestibles du Parc National Fazao-Malfakassa (PNFM) au Togo (Afrique de l'Ouest): Diversité et connaissances ethnomycologiques. *Agronomie Africaine*, *27*(1), 37-46.

Marchal et Bourdon,1982. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.

Marchall et al., 1982. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.

Marschner et Timonen, 2005. Interactions between plant species andmycorrhizal colonization on the bacterial community composition in therhizosphere. Applied soilecology. 28: 23-36.

Martinez-Salgado et al.,2010. Biological soil quality indicators: a review. In A.Mendez-Vilas (ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. p. 319-328.

Mckay et al., 1987. Sodium bicarbonate attenuates pain on skin infiltration with lidocaine, with or without epinephrine. *Anesthesia & Analgesia*, *66*(6), 572-574.

Mebarki et Benakli 2018. Evaluation de l'activité antagoniste de deux bacteries: Pseudomonas sp et Bacillus sp vis-àvis des champignons phytopathogénes. Diss. Université Mouloud Mammer.

Misaghi et al., 1992. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. *Food control*, *17*(3), 183-188.

Mobley et al., 1995. Molecular biology of microbial ureases. Microbiological reviews, 59(3), 451-480.

N

Nannipieri et al., 2008. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. In *Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence* (pp. 339-365). Springer, Berlin, Heidelberg.

Naik et Sakthivel, 2006. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclasticPseudomonassp.strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. Res. Microbiol,157: 538-546.

Naitmerzougui,2014. Application des tiges de dattes dans l'adsorption de polluants organique , Mémoire en magister, Université Mohamed Cherif Massaadia Souk-Ahras.

Nannipieri et al., 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. In *Phosphorus in action* (pp. 215-243). Springer, Berlin, Heidelberg.

Nasr et al, 2012. Biofilm formation and presence of ica AD gene in clinical isolates of staphylococci. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics 1110-8630.

Nawab et al.,2016. Modeling and analysis of the creep behavior of jute/green epoxy composites incorporated with chemically treated pulverized nano/micro jute fibers. Industrial Crops and Products, 84, 230-240.

Ningthoujam et al., 2009. Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. World Applied Sciences Journal. 7: 907-916.

O

Ouahmane et al.,2007. Valoriser et conserver les ressources forestières méditerranéennes: rôle potentiel des champignons mycorhiziens associés à la strate arbustive pionnière.

P

Pagga et Brown ,1986. The degradation of dyestuffs: Part II Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*, *15*(4), 479-491.

Palmieri et al., 2005. Conjugate additions of nitroalkanes to electron-poor alkenes: Recent results. Chemical reviews, 105(3), 933-972.

Patten et Glick, 2002. Role of Pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and environmental microbiology, 68(8), 3795-3801.

Paul et Clark, 1996. A revision of Cryptosoma Brullé, 1837 and Cycloes de Haan, 1837 (Crustacea: Brachyura: Calappidae). Zoological Journal of the Linnean Society, 117(2), 175-204.

Pedraza, 2008. Recent advances in nitrogen-jixing acetic acid bacteria.

Petit et Jobin, 2005. La fertilisation organique des cultures les bases. Fédération

d'agriculture biologique du Québec. Bibliothèque nationale de Canada, 48p.

Pochon et Tardieux ,1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol (Vol. 11). Editions de la Tourelle.

Prasad et Aikat, 2014. Study of bio-degradation and bio-decolourization of azo dye by Enterobacter sp. SXCR. *Environmental technology*, *35*(8), 956-965.

Prescott, 2007. Microbiologie. Ed, De Boeck université, p.492.

R

Radhakrishnan et al.,2006. Effects of confinement on freezing and melting. Journal of Physics: Condensed Matter, 18(6), R15.

Raj et al., 2009. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(28), 11667-11672.

Raghavacharya, 1997. Colour removal from industrial effluents: a comparative review of available technologies. Chemical engineering world, 32(7), 53-54.

Rayavarapu et Padmavathi ,2016. Bacillus sp. as potential plant growth promoting rhizobacteria. Int J Adv Life Sci 9.1 (2016): 29-36

Richardson et Simpson, 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. Plant and soil, 349(1), 121-156.

Russo et al.2005. Effect of Azospirillum inoculants on arbuscularmycorrhiza establishment in wheat andmaize plants. Biology and fertility of soils. 41: 301-309.

S

Salamone et al., 2005. Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. PGPR: biocontrol and biofertilization, 173-195.

Saratale et al., 2006. Biodegradation of Malachite Green by Kocuria rosea MTCC 1532. Acta Chimica Slovenica, 53(4).

Saratale et al.,2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. Journal of the Taiwan institute of Chemical Engineers, 42(1), 138-157.

Saratale et al.,2013. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye CI Remazol Red and textile effluent by isolated Lysinibacillus sp. RGS. Journal of bioscience and bioengineering, 115(6), 658-667.

Satyendra et Manikant, 2017. Microbial strategies for discoloration and detoxification of azo dyes from textile effluents. Research Journal of Microbiology 12.1 (2017): 1-19.

Selvam et al.,2003. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus Thelephora sp. *Bioresource Technology*, *88*(2), 115-119.

Saviozzi et al., 2001. A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. *Plant and soil*, *233*(2), 251-259.

Skujins,1986. Development of a sensitive biological method for the determination of a low-level toxic contamination in soils. *Swedish Journal of Agricultural Research* 16.3 :113-118.

Smalla et al.,2000. Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 66.11: 4854-4862.

Smibert et Krieg, 1994. Methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology, Washington, DC*, 607-654.

Solís et al. 2012. Microbial decolouration of azo dyes: a review. Process Biochemistry, 47(12), 1723-1748.

Simin et al., 2017. Locking of electron spin coherence above 20 ms in natural silicon carbide. *Physical Review B*, *95*(16), 161201.

Sierra ,1957. Studies on bacterial esterases. *Antonie van Leeuwenhoek*, *23*(1), 241-265.

Singh et al., 2015. Textile Dyes Degradation, A Microbial Approach for Biodegradation of Pollutants, Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters, Environmental Science and Engineering, Springer International Publishing Switzerland 187-204.

Singh et al., 2015. Degradation of anthroquinone Dyes Stimulated by Fungi, Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters, Environmental Science and Engineering, Springer International Publishing Switzerland, 333-352.

Sudha et al.,2018. Ultraconformable temporary tattoo electrodes for electrophysiology. Advanced Science 5.3 : 1700771.

Sukumaran et al., 2005. Identifying the primitive path mesh in entangled polymer liquids. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, *43*(8), 917-933.

Sugiyama, 1951. Studies on factors affecting the heat resistance of spores of Clostridium botulinum. Journal of bacteriology, 62(1), 81-96.

Specht K., Platzek T,Textile dyes and finishes - Remarks to toxicological and analytical aspects, Deut. Lebensm.-Rundsch. 91- 352-359. textile effluent: 388 Adsorption du bleu de méthylène a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresour.Technol .,(1995)., 77, 247-255.

$\mathcal{T}$

Taylor et Jacobs, 1996. Water treatment membrane processes. MCGRAW HILL, New-York, NY, 1996. TAYLOR, J.S., JACOBS, E. P. Water treatment membrane processes. MCGRAW HILL, New-York, NY.

Tiar et al.,2018. Molecular modeling of cationic dyes adsorption on agricultural Algerian olive cake waste. *Journal of Molecular Liquids*, *264*, 127-133.

Timmusk et al.,2013. Rhizobacterial plant drought stress tolerance enhancement: towards sustainable water resource management and food security. J.Food Sec., 1:6- 9.

Touati et al.,2007. Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de Staphylococcus epidermidis isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques, Pathologie Biologie, 55 : 277–282.

$\mathcal{V}$

Van Loon, 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research : 243-254.

Varma et al., 2006. Revisiting nucleophilic substitution reactions: microwave-assisted synthesis of azides, thiocyanates, and sulfones in an aqueous medium. *The Journal of organic chemistry*, *71*(17), 6697-6700.

Vendevivre et al.,1998. Treatement and creuse from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. Journal of Chem. Technol. Biotechnol, vol 72, p 289-302.

$\mathcal{W}$

Walter et Vega, 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 60(1), 3621-3643.

Willmott, N., Priestley, J. V., Michael, G. J & Averill, S., Liu, M., &. (2002). Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, *80*(5), 495-505.

Whipps 2001. Microbial Interaction and Biocontroll in the Rhizosphere. Journal of Experimental Botany. 52, 487-511.

Woyessa et Assefa, 2011. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobaceria on Growth and Yield of Tef Eragrostis tef Zucc. Trotter) under Greenhouse Condition. Research Journal of Microbiology, 6(4), 343.

x

Xinying et al., 2017. valuation de l'initiation du fébuxostat durant une crise de goutte aiguë. Étude clinique randomisée prospective." *Revue du Rhumatisme* 88.3 (2021): 216-222

y

Yang et al., 2006 . Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. J. Environ. Sci. 18, 1135–1141.

Yang et al., 2006. Effects of cadium, zinc and lead on soil enzyme activities. J. Environ.18 (6): 1135-114.

Yatome et al.,1991. Degradation of crystal violet by Bacillus subtilis. Journal of Environmental Science & Health Part A, 26(1), 75-87.

Yeoh et al.,1985. Thermophilic anaerobic contact digestion of palm oil mill effluent. Water Science and Technology, 17(2-3), 155-166.

z

Zaviska et al.,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.

Zhou et al.,1993. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. Microbiol. Lett., 107, 157-161.

Zoe et Cardon, 2007. Photosynthetic recovery following desiccation of desert green algae (Chlorophyta) and their aquatic relatives. *Plant, cell & environment*, *30*(10), 1240-1255.

Annexes

Annexe 01 : Appareillages et verreries

Appareillage	Verreries	Autre matériel
➢ Autoclave ➢ Bain marie ➢ Balance électrique ➢ Etuve ➢ Réfrigérateur ➢ Microscope optique ➢ PH-métre ➢ Plaque chauffante ➢ Vortex ➢ Spectrophotométre	➢ Becher ➢ Boite de pétri ➢ Erlenmeyer ➢ Fiole ➢ Tubes à essai ➢ Flacons ➢ Lames et lamelles	➢ Ance de platine ➢ Pipette pasteur ➢ Micro-pipette ➢ Gants jetable ➢ Bec benzen ➢ Papier aluminium,film et absorbant ➢ Portoir

Annexe 02 : Les compositions de solutions

Solution de stock glycérol à 80 %

Glycérol 80 ml

Eau distillée 20 ml

Solution sulfate d'ammonium

Sulfate d'ammonium 50g

Eau distillée 100ml

Solution tampon phosphate

NaSpo4 09g

Eau distillée 1000ml

Solution NaOH

NaOH

Solution d'urée

Urée 4g

Eau distillée 100ml

TSB

TSB 3g

Eau distillée 1000ml

Cristal violet

Violet de gentiane 1g

Acide phénique 2g

Alcoolà 95% 10ml

Eau distillé 100ml

Lugol

I2 1g

KI 2g

Alcool à 95% 10ml

Eau distillée 100ml

Fuchsine

Fuchsine basique 1g

Acide phénique 5g

Alcool à 95% 10ml

Eau distillée 100ml

Annexe 03 : Préparation et composition des milieux de cultures pour 1litre

Technique de préparation :

Pour chacun des milieux, les ingrédients sont pesés à l'aide d'une balance de précision et déposés dans une fiole jaugée puis rajouter le volume d'eau distillée à raison de 1000 ml. Le pH est mesuré par un pH-mètre puis ajusté par l'ajout soit du KOH ou du HCl ensuite répartir dans des flacons de 250 ml et autoclavés à 115°C pendant 15 minutes, une fois refroidies (45°C), l'antifongique (Terbinafine carbohydrate) est rajouté à raison de 5ml/l à l'aide d'un micro-filtre stérile de diamètre 0.22µm.

NBRIP

Glucose 10g

$Ca_3(PO_4)_2$ 05g

$(NH_4)_2SO_4$ 0.1g

Nacl 0.2g

$MgSO_4.7H_2O$ 0.25g

KCL 0.2g

Agar 15g

Milieu à base de pectine

Pectine 02g

Urée 0.05g

$(NH_4)_2SO_4$ 0.15g

Agar 20g

Gélose au lait

Lait écrémé poudre 05g

Gélose nutritive

Peptone 15g

Extrait de viande 10g

Extrait de levure 02g

Chlorure de sodium 05g

Agar 20g

Gélose au Tween 80

Peptone 10g

Nacl 5g

CaCl2.2H2O 0.1g

Tween 80

Agar 18g

TSA 1/10 à 1% Amidon

TSB 3g

Amidon 10g

Agar 15g

Milieu à base de gélatine

TSB 3g

Gélatinase 6g

Agar 15g

Milieu Carder

Na2 HPO4 6g

KH2 PO4 3g

NaCl 0.5g

NH4 Cl 1g

Extrait de levure 3g

CMC (Carboxy-Methyl-Cellulose) 5g

Agar 15g

Milieu à base de peptone

Peptone 1g

Glucose 1g

NaCl 5g

Na2HPO4 1.2g

KH2PO4 0.8g

Rouge de phénol 0.012g

Solution d'urée 50ml

Agar 15g

Milieu Mannitol Mobilité Nitrat

Hydrolysat trypsique de caséine 20g

Mannitol 15g

Rouge de phénol 0.08g

Nitrat de potassium 2g

Agar 7g

TSA 1/10

TSB 3g

Agar 15g

Rouge Congo Agar

Cœur cervelle 37g

Saccharose 50g

Rouge Congo 0.8g

Agar 10g

Annexe 04 : coloration de gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Déposer une goutte d‘eau physiologique stérile sur une lame bien propre.

- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d‘eau, strier et sécher par passage

rapide sur la flamme d’un bec benzen.

- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.

- Laver à l‘eau distillée pendant 5 secondes.

- Ajouté du lugol pendant 60 secondes.

- Laver à l‘eau distillée pendant 5 secondes.

- Décoloré avec l’alcool 95%. Pendant 15 min.

- Laver à l‘eau distillée pendant 5 secondes.

- Ajouter la fuschine et laisser pendant 60 secondes.

- Laver à l‘eau.

- Après séchage déposer une goutte d‘huile à immersion sur le frottis et observer au microscope

à au grossissement (× 100).

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence,

contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.