

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Microbiologie en Secteur Génie Biologique



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Optimisation du rendement de la réduction des métaux lourds par une souche d'actinobactéries *streptomyces*. sp D1 par le biais de plan composite centré

Présenté par :

DJERRAH Samira

FAIDI Yasmine

Soutenu le : 20 Juin 2017

Devant le jury

Mr KECHA.M

Professeur Président

M^{me} ARKOUB.W

MCB Encadreur

Mme CHIBANE.N

MAA Examinatrice

Année universitaire
2016/2017

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes parents, mais aucune dédicace ne serait témoin de mon profond amour, mon immense gratitude et mon plus grand respect ;

À mes chers sœur et frère : Hakima, Yakout, Fatiha et Dada Nacer ;

À mes chers amis : Yasmine, Zahra, Samia, Siham, Akila, Naima, Soula, Hakima, Saida, Fatiha et sans oublier my spy chuck ;

À tout mes amis de promotion (2016/2017), ainsi tous mes enseignants sans exception.

Samira

Dédicaces

Je dédie ce travail qui me tient à cœur à

Ma mère, pour ses précieux conseils et son soutien et son encouragement tout au long de mes études.

Mon père, mon frère Belkacem, ma grande sœur Hadjer, et ma chère petite sœur Nour (Bida), le simple fait de leurs présences me donne la force d'avancer.

Ma meilleure amie et ma binôme Samira en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments qu'on a partagé.

Toute ma famille surtout ma grand-mère zohra et ma tante Nabila et ses enfants.

Tous mes amis de la promotion 2016 /2017 en particulier : Fatiha, Akila, Naima, Samira2, Yasmina, Hakima, Nawal d'avoir vécu ensemble des moments inoubliable. Sans oublier Hmana, yanis, et bilal.

Et Pour tout qui me connais au pré ou de loin.

Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Yasmine

Remerciements

Remerciant tout d'abord Dieu tout puissant de nous avoir donné la force de réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciements à : Notre promotrice M^{me} Arkoub Warda, pour son aide et ces conseils et son bonne humeur. Nous lui témoignons, nos gratitude et nos reconnaissances et sans oublier M^{elle} djinni pour ces orientations.

Nos remerciements s'adressent ainsi à Mr Kecha d'avoir accepté de présider le jury et à M^{me} Chibane d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions l'ensemble du personnel du laboratoire pour nous avoir permis d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de notre travail

Nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui nous ont appris beaucoup de choses et qui nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleurs conditions.

Samira et Yasmine

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

| | |
|--------------------|---|
| Introduction | 1 |
|--------------------|---|

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|---|
| I. Généralités sur les actinobactéries..... | 2 |
| I.1. Ecologie des actinobactéries | 3 |
| I.2. Taxonomie des actinobactéries | 3 |
| I.3. Cycle de vie du genre <i>Streptomyces</i> | 3 |
| I.4. Importance des actinobactéries | 4 |
| II. Métaux lourds | 5 |
| III. Modélisation statistique : les plans d'expériences..... | 6 |
| III.1 Définition et généralité..... | 6 |
| III.2 Matrice d'expériences | 7 |
| III.3 Optimisation | 7 |
| III.4 le plan composite centré..... | 8 |

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

| | |
|---|---|
| I. Matériel..... | 9 |
| I.1 Matériel analytique | 9 |
| I.2 Matériel biologique..... | 9 |
| 2.1 Microorganisme étudiés | 9 |
| 2.2 Revivification et repiquage de la souche..... | 9 |
| II. Méthodes | 9 |

| | |
|--|----|
| II.1 Etude morphologique de la souche D1 | 9 |
| 1.1 Caractéristiques macromorphologiques | 9 |
| 1.2 Critères micro morphologiques | 9 |
| II.2 Etudes de la résistance aux métaux lourds de l'isolat D1 sur milieu solide | 10 |
| II.3 Etude de la réduction des métaux lourds par l'isolat D1 sur milieu liquide | 10 |
| 3.1 Préparation de l'inoculum et culture de la souche | 10 |
| 3.2 Dosage des métaux lourds par la SAA..... | 10 |
| 3.3 Suivi de l'évolution du pH | 10 |
| 3.4 Détermination du poids sec | 11 |
| II.4 Modélisation du rendement de réduction des métaux lourds par la souche étudiée D1 | 11 |

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

| | |
|---|----|
| I. Mise en évidence de la résistance de la souche D1 aux différents métaux lourds | 14 |
| II. Mise en évidence de la réduction des métaux lourds sur milieu liquide par la Spectrophotométrie d'Absorption Atomique de la souche D1 | 17 |
| III. Etude de la cinétique de croissance de la souche D1 sur différents milieux en présence de métaux lourds | 19 |
| III.1 Estimation du Poids sec..... | 19 |
| III.2 Suivi de l'évolution du pH après la réduction des métaux lourds..... | 20 |
| VI. Etude des caractères morphologiques de la souche D1 | 21 |
| VI. 1. Caractères macromorphologiques | 21 |
| VI .2. Critères micromorphologiques | 23 |
| V. Modélisation du rendement de réduction du cuivre | 23 |
| VI. Analyse statistique du model | 25 |

| | |
|---|----|
| VI.1 Vérification de la signification des coefficients par le test de Student | 25 |
| VI.2 Analyse de variance (ANOVA) | 26 |
| VI.3 Diagramme des résidus | 27 |
| VII. Optimisation du rendement de réduction du cuivre | 28 |
| Conclusion | 33 |

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des tableaux

| Tableau N° | Titre | Page |
|------------|--|------|
| I | Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés à différents niveaux | 11 |
| II | Matrice d'expériences du plan composite pour quatre paramètres | 12 |
| III | la croissance de la souche D1 sur des milieux de culture additionnés avec différents métaux lourds | 14 |
| IV | rendements de la réduction des métaux lourds par la souche D1 | 18 |
| V | Caractéristiques macromorphologiques de la souche D1 après 7 jours d'incubation à 28°C sur différents milieux en présence de métaux lourds | 22 |
| VI | La matrice d'expériences et les valeurs du rendement de réduction obtenues | 24 |
| VII | Valeurs estimés des coefficients du model (en unités codées) | 25 |
| VIII | Résultats de l'analyse de variance | 26 |

Liste des figures

| Figure N° | Titres | Page |
|-----------|---|------|
| 1 | Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> | 4 |
| 2 | Mise en évidence de la résistance de la souche D1 sur les métaux lourds testés | 16 |
| 3 | Croissance de la souche D1 sur les milieux : BN-Cr, BN-Pb et BN-Cu respectivement | 17 |
| 4 | Variation du poids sec en fonctions de différents métaux lourds sur milieu liquide | 20 |
| 5 | Variation de la valeur pH en présence de différents métaux lourds | 21 |
| 6 | Observation au microscope optique de la souche D1 (G×40) incubée pendant 7 jours à 28°C sur milieu NA | 23 |
| 7 | Diagramme des résidus | 27 |
| 8 | Surface de réponses pour $x_2= 0,36$ et $x_3= -2$ | 30 |
| 9 | les courbes isoréponses pour différents niveaux de x_3 | 31 |

BN-Zn : Bouillon nutritif-zinc

BN-Fe : Bouillon nutritif-Fer

BN-Cu : Bouillon nutritif-Cuivre

MA : Mycélium aérien

MS : Mycélium du substrat

EM : Eau de mer

NA : Agar nutritif

NA-Cd : Agar nutritif -Cadmium

NA-Cr : Agar nutritif -chrome

NA-Cu : Agar nutritif -Cuivre

NA-Fe : Agar nutritif -Fer

NA-Zn : Agar nutritif -Zinc

NA-Mélange : Agar nutritif-(chrome, plomb, cuivre, Fer, zinc)

SCA : Amidon Caséine Agar

SAA : Spectrophotométrie d’Absorption Atomique

Introduction

L'industrialisation des zones urbaines et des activités humaines telles que les tanneries, la batterie, l'exploitation minière et l'utilisation d'engrais chimiques rendent l'environnement pollué avec des métaux lourds plus que jamais (Ozturk et al., 2004). La libération de ces métaux dans l'environnement peut entraîner de sérieux risques pour la santé humaine et l'écosystème (Selvin et al., 2009). Bien que certains métaux sont des oligo-éléments nécessaires et essentiels à de faibles concentrations mais, en concentrations élevées, ont des effets toxiques pour les organismes, alors que certains d'autres non essentiels ne présentent aucun avantage biologique et ils sont totalement toxiques (Srivastava et Majumder, 2008).

L'élimination de ces polluants de l'environnement est devenue un sujet essentiel au cours des dernières décennies, plusieurs études ont fait l'objet de résoudre ce problème majeur par le biais de divers processus, parmi eux la bioremédiation, avec sa performance parfaite et du faible coût, qui implique l'utilisation de microorganismes, pour dégrader et réduire la toxicité des contaminants environnementaux (Boopathy, 2000).

Les actinobactéries constituent une grande partie significative de la population microbienne du sol, ainsi que des milieux marins (lam, 2006). Avec la grande puissance des actinobactéries en production de plusieurs métabolites et enzymes secondaires peuvent être considérés comme les principaux facteurs de résistance au stress environnemental (Hamedi, et al., 2015).

Le but de la présente étude est de tester la résistance et la réduction d'une souche *d'actinobactéries* nommée D1 vis-à-vis de cinq métaux lourds (cuivre, zinc, chrome, plomb, cadmium et fer) afin de sélectionner le métal le plus réduit dans l'objectif d'optimiser le rendement de la réduction de ce dernier par le biais d'un plan d'expérience de type composite centré.

Ce mémoire est structuré essentiellement en trois chapitres :

Le premier chapitre est dédié à une synthèse bibliographique qui présentera des généralités sur les actinobactéries et des connaissances sur les métaux lourds, ainsi que des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences. Le deuxième chapitre est consacré à l'étude des critères morphologiques de la souche D1 ainsi la mise en évidence de la résistance aux métaux lourds sur milieu solide et liquide suivi d'une modélisation du rendement de réduction du métal sélectionné par la souche D1. Le troisième chapitre discutera les résultats obtenus au cours de notre étude. Enfin, on clôture notre travail par une conclusion générale.

Chapitre I

Synthèse

Bibliographique

I. Généralités sur les actinobactéries

Les actinobactéries sont des bactéries mycéliennes à Gram positif, aérobies et hétérotrophes. Elles présentent certaines analogies avec les champignons dont la structure mycélienne présentant des ramifications, formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidie, etc... (Küster et Williams, 1964). Etymologiquement, le mot Actinobactérie a été dérivé des mots grecs «Aktis» qui veut dire rayon et «mykes» pour champignons «Champignons à rayons» ou «Champignons rayonnants» (Lamari, 2006). Ce sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires à la morphologie complexe (Colombié, 2005 ; Eunice et Prosser, 1983), formant des filaments minces, septés et ramifiés (Dgigal, 2003); possédant un coefficient de Chargaff (GC%) élevé compris entre 60-70% (Larpen et Sanglier, 1989). La plupart des espèces sont immobiles (Ensign et *al.*, 1993), mésophiles et croissent de façon optimale dans la gamme de pH 5 à 9 avec une proximité optimale à la neutralité (Goodfellow et Williams, 1983). Ces micro-organismes comptent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets ou rarement mycélium rudimentaire), ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. Les formes évoluées possèdent un mycélium du substrat, surmonté par un mycélium aérien sporulant (reproduction asexuée) qui leur confère un aspect fongique (Lamari, 2006).

I.1 Ecologie des actinobactéries

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (Peraud, 2006). La grande majorité est d'origine tellurique 10 à 20% ou parfois plus (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Ishizawa et Araragi, 1976). Les actinobactéries peuvent se développer à l'état libre ou en association avec les plantes non légumineuses (symbiose) (Verma et *al.*, 2009) comme le genre *Frankia* (Benson et Silvester, 1993).

Ces microorganismes sont largement répandus dans les sols qui demeure le réservoir le plus riche (Bakour, 2006), ils ont des aptitudes à coloniser de nombreux biotopes (air, fumier...) (Badji, 2006 ; Peraud, 2006), on peut les retrouver aussi en milieu aquatique : dans les mers, les lacs, les rivières... (Weyland, 1986), comme on peut les retrouver chez les végétaux, animaux et l'homme.

I.2 Taxonomie des actinobactéries

La taxonomie des actinobactéries a beaucoup évolué au cours des vingt à trente dernières années en même temps qu'évoluait le nombre de genres d'actinomycètes (Zermane, 2007).

La classification établie des groupes taxonomiques (taxon). Ceux-ci sont établis selon des critères phénotypiques et moléculaires à défaut de bases phylogéniques (Kitouni, 2007)

Les actinobactéries appartiennent au règne des procaryotes, sont classées dans le phylum des *Actinobacteria* à la classe des *Actinobacteriaceae* qui comporte six ordres parmi lesquels figure l'ordre des *Actinomycetales* s'avère le plus important (Bergey's Manual, 2012).

I.3 Cycle de vie du genre *Streptomyces*

Le cycle de vie de nombreux actinobactéries tels que les streptomycètes débute par la germination d'une spore, cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (O'Gara et al, 2008). Ce dernier est ancré dans le support solide dans lequel il puise les nutriments, cette aptitude de formation de mycélium du substrat montre la capacité des actinobactéries à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (Emerson et al., 2012).

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium aérien ou secondaire, composé d'hyphe, dressé sur le mycélium du substrat. Ils sont souvent pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe, une fois développé, le mycélium aérien couvre les colonies de surface donnant un aspect poudreux compact, poilu ou en chou-fleur (Kitouni, 2007),

En milieu solide, les spores produisent un tube germinatif qui va croître pour donner des hyphes qui vont à leur tour se ramifier en un mycélium primaire, un mycélium aérien va ensuite se développer sur la colonie.

Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* peuvent produire une large variété de pigments responsables de la couleur du mycélium végétatif et aérien. De plus, en fonction des conditions de culture, des pigments diffusibles peuvent être formés (Dworkin et al., 2013).

En milieu liquide, la culture nécessite une aération du milieu par agitation, et ou par injection d'air. Les cultures se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si certaines souches peuvent sporuler dans cet environnement (Madigan et al., 1997).

Les *Streptomyces* croissent par élongation des filaments et peuvent par la suite présenter d'autres types de morphologies (Saffroy, 2006).

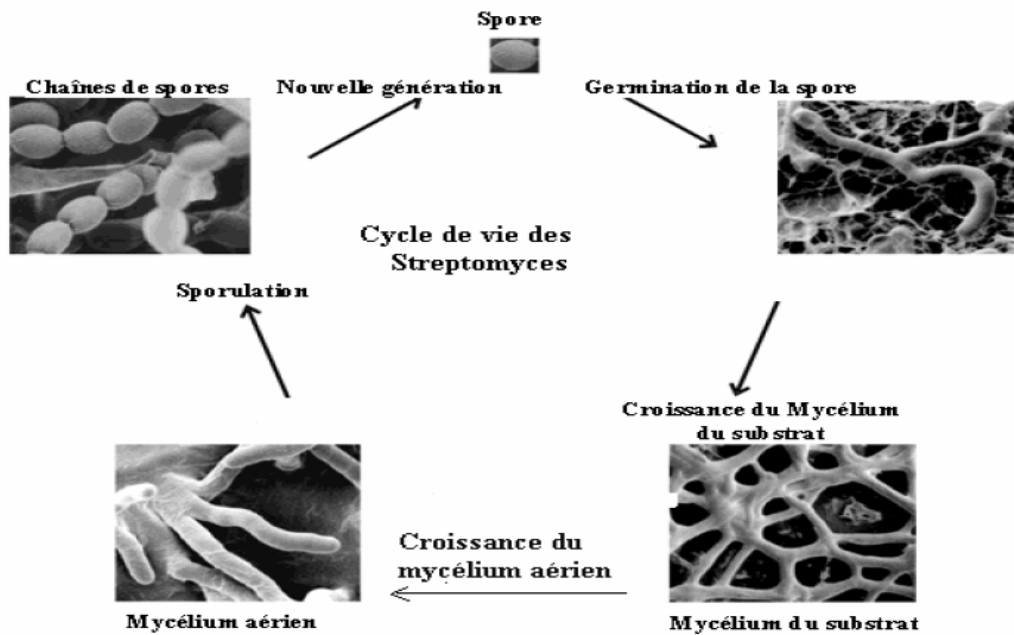


Figure 1 : Cycle de développement du genre *Streptomyces*

I.4 Importance des actinobactéries

Les actinobactéries possèdent des rôles importants dans divers domaines tels que le secteur industriel et en particulier pharmaceutique dont ils sont la source de la plupart des antibiotiques utilisés en médecine aujourd'hui (Prescott et al., 2003).

Ces microorganismes sont aussi importants en écologie qu'en médecine, En effet, le sol représente le biotope naturel pour la plupart des espèces connues, elles sont capables de dégrader plusieurs molécules complexes tels que la pectine, la chitine...etc. Elles contribuent ainsi à la minéralisation et la fertilisation des sols (Prescott et al., 2010). De plus, ces bactéries sont vitales pour le recyclage des nutriments et comptent parmi un nombre réduit d'organismes utilisés en bioremédiation (Goodfellow et Williams, 1983). Elles sont aussi capables de dégrader ou de recycler certaines toxines produites par des champignons

toxigènes et réduire ainsi leur teneur dans les produits fini en industrie agro-alimentaire (Holzapfel et al., 2002). Par ailleurs ces bactéries ont l'avantage d'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire et sont capables de dégrader des hydrocarbures chlorés ainsi que des composés organiques complexes (El-Shatoury et al., 2004).

Une autre caractéristique de la symbiose vu chez le genre *Frankia* qui forme des nodules au niveau des racines de certaines plantes, ou parfois les tiges qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique (Perry et al., 2004).

II. Métaux lourds

Les métaux lourds sont définis sur la base de trois critères différents qui comprennent la densité, le nombre atomique ou leurs propriétés chimiques (Siddiquee et al., 2015). Ils sont d'origine naturelle et anthropique (Nriagu, 1989).

Certains de ces métaux, comme le zinc, le fer ou le cuivre, sont indispensables aux processus biologiques et deviennent toxiques à partir d'une concentration seuil comme l'exemple du cuivre qui est essentielle pour les organismes vivants, car il agit comme antioxydant dans la chaîne de transport d'électrons ainsi que dans le collagène et l'élastine (Siddiquee et al., 2015). Alors que d'autres métaux sont toxiques même à faible concentration (cas du mercure et du cadmium) (Mills and Colwell, 1977).

La plupart de ces métaux, tels que le plomb, le cadmium, le cuivre, le zinc, et le mercure ne sont pas biodégradable, donc persistent dans l'environnement pendant de longues périodes, ce qui pose un problème majeur en écologie mais également pour la santé publique (Zouboulis et al., 2004).

De ce fait, il existe plusieurs méthodes de la dépollution des métaux lourds tels que les méthodes physico-chimiques, les méthodes biologiques qui utilisent des micro-organismes comme les bactéries du genre *actinobactéries*, qui sont connus pour être des agents très importants dans la bioremédiation. Des technologies de cette dernière ont été effectués par Elekwachi et al., (2014), ainsi qu'une autre étude réalisée par Amoroso et al., (1998) qui ont démontrés que les *actinobactéries* résistent aux métaux lourds sous différentes concentrations peut être utile dans la bioremédiation des sédiments contaminés. Cependant, l'espèce *Streptomyces sp* a été étudiée par Ashok et al., (2011) sur trois métaux lourds à savoir le

cuivre, le chrome, et le plomb dont le potentiel de bioremédiation était de 18%, 72% et 32,5% respectivement, ce qui montre que la souche *Streptomyces sp* est très puissante pour l'élimination du chrome dans les déchets.

Ces bactéries ont élaborés plusieurs mécanismes qui leurs permettent de persister et/ou de croître. Bruins et al., (2000) distinguent quelques mécanismes de résistance bactérienne au métaux :

- L'exclusion par perméabilité de la membrane ou le maintien de l'ion toxique hors de la cellule (réduction de l'absorption) ;
- L'efflux actif : il s'agit du mécanisme de transport actif pour exporter les métaux toxiques depuis leur cytoplasme jusqu'au milieu extracellulaire. Chez *P. aeruginosa*, l'ion Cu^{2+} est exporté par un mécanisme impliquant 4 protéines séquestrant le cuivre dans le périplasme (Cooksey, 1994) ;
- La séquestration intracellulaire : elle permet la séquestration au sein du cytoplasme, pour immobiliser rapidement les métaux et éviter leurs effets toxique
- La détoxification enzymatique (oxydo-réduction) : c'est la conversion d'un ion très toxique à un ion moins toxique ;
- La réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des métaux : cette protection se déroule par mutation, diminuant ainsi la sensibilité sans altérer les fonctions de base de la cellule ;

III modélisation statistique : les plans d'expériences

III.1 Définition et généralités

Les plans d'expériences organisent et optimisent les essais dans le but d'acquérir le maximum de renseignements à partir d'un minimum d'expériences permettant ainsi d'accroître la précision sur les réponses calculées avec un modèle.

De manière générale, la méthode des plans d'expériences cherche à déterminer et à établir les liens existants entre deux types de variables :

La réponse : grandeur physique étudiée ;

Les facteurs : grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, sensés influencer sur les variations de la réponse.

Un plan d'expériences consiste à établir **un modèle**, exprimant la réponse en fonction des facteurs, sur la base des expériences ainsi que l'équation correspondante aux variations du phénomène étudié en fonction des facteurs influents (Goupy, 1999).

Ce modèle appelé « modèle postulé » peut être écrit sous cette forme :

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{\substack{u,j=1 \\ u \neq j}}^k b_{uj} x_u x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 \dots + \varepsilon$$

b_0 : Terme constant de l'équation de régression ;

b_j : Effets linéaires ;

b_{uj} : Effets d'interactions ;

b_{jj} : Effets quadratiques ;

III.2 Matrice d'expériences

La matrice d'expérience est le tableau qui indique le nombre d'expériences à réaliser avec la façon de faire varier les facteurs et l'ordre dans lequel il faut réaliser les expériences (Goupy, 1999).

III.3 Optimisation

D'après Goupy (1999), l'optimisation d'un processus quelconque consiste à trouver l'optimum d'une fonction donnée, qui correspond aux conditions optimales de conduite de ce processus.

Cette étape a pour principe le développement des modèles mathématique de second degré.

Il existe plusieurs types de plans d'optimisation tels que ;

- **Le plan de Doehlert**
- **Le plan de Box-Behnken**
- **Le plan composite centré**

III.4 le plan composite centré

Selon Goupy, (2006), les plans composites prennent facilement la suite d'un premier plan factoriel dont les résultats sont insuffisamment expliqués par un modèle du premier degré. Il suffit d'effectuer les expériences correspondant aux points en étoile et de faire les calculs sur l'ensemble de toutes les expériences. Les plans composites sont parfaitement adaptés à une acquisition progressive des résultats. Ce plan est constitué de trois parties :

Les N_f expériences du plan factoriel dont les facteurs prennent deux niveaux ($N_f = 2^k$), avec k nombre du facteur

Les N_0 points au centre (N_0);

Les N_α points « en étoile », situés symétriquement sur les axes du domaine à une distance $\pm \alpha$ du centre, ($N_\alpha = 2k$), avec α est appelé « bras de l'étoile ».

Les coordonnées des points en étoile dépendent du critère d'optimalité choisi. En général, on retient le critère de presque orthogonalité ou le critère d'isovariance par rotation.

Le nombre N , des essais d'un plan composite est comme suit :

$$N = N_f + N_0 + N_\alpha$$

Chapitre II

Materiel

et

Méthodes

I. Matériel**I.1 Matériel analytique :**

Le matériel utilisé dans cette étude est résumé en annexe I.

I.2 Matériel biologique**2.1. Microorganisme étudiés**

La souche d'actinobactéries étudiée dans ce travail est notée *Streptomyces* sp. D1 appartient à la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'université A. MIRA de Bejaia. Elle a été isolée en juillet 2012 à partir de sédiment marins de la région de Bejaia (Djinni et al., 2013).

2.2. Revivification et repiquage de la souche

L'isolat conservé sur milieu amidon caséine agar (SCA) en présence de 50% d'eau de mer à 4°C a été repiqué sur ce même milieu puis incubé à 28°C pendant 7 à 10 jours. La composition du milieu utilisé est donnée en Annexe II.

II. Méthodes**II.1 Etude morphologique de la souche D1****1.1. Caractéristiques macromorphologiques**

Cette étude consiste à la détermination de l'aspect général des colonies, la couleur des mycéliums aérien (MA) et du substrat (MS), ainsi que les pigments solubles produits sur les différents milieux d'agar nutritif additionnés de métaux lourds.

1.2. Critères micro morphologiques

C'est une observation microscopique de la boîte de pétri après 7 jours d'incubation, placée directement sous le microscope optique à des grossissements (X10 et X40).

II.2 Etudes de la résistance des métaux lourds de l'isolat D1 sur milieu solide

Dans le but d'étudier la résistance aux métaux lourds de la souche étudiée D1, différents milieux de culture à base d'agar nutritif contenant différents métaux lourds : le cadmium ($\text{Cd}_3\text{N}_2\text{O}_6$) ; le chrome ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ; le cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) ; le fer ($\text{FeN}_3\text{O}_9, 7\text{H}_2\text{O}$) ; le zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$), le plomb ($\text{N}_2\text{O}_6\text{Pb}$) et enfin le mélange des métaux cités précédemment, à raison de 50 mg/L (Daboord et al, 2014), sontensemencés avec l'isolat. Les boîtes sont par la suite incubées pendant 7-14 jours à 28°C. L'appréciation de la résistance ou la sensibilité de la souche aux différents métaux lourds est donnée en fonction de la croissance de cette dernière sur les milieux en question.

II.3 Etude de la réduction des métaux lourds par l'isolat D1 sur milieu liquide

3.1. Préparation de l'inoculum et culture de la souche

Ce test a pour objectif d'étudier la capacité des isolats à réduire les métaux lourds. Après l'incubation on découpe stérilement des cylindres d'agar de 6mm de diamètres à l'aide d'un emporte-pièce, les déposés dans des flacons de 200ml contenant 50ml de bouillon nutritif avec une concentration de 50 mg/l du métal en question [cuivre, chrome, fer, zinc, cadmium ou le plomb]. Laisser incuber à 28°C pendant 7 jours sous agitation à 125 tours/min.

3.2. Dosage des métaux lourds par la SAA

Après l'incubation, les cultures sont filtrées à l'aide d'un filtre de type Whatman N°1, afin de séparer la biomasse mycélienne du milieu de culture (filtrat), les filtrats sont ensuite stérilisés avec un filtre à seringue de 0,45 μm de diamètre.

Le dosage de ces métaux lourds présents dans les filtrats est réalisé par la Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA). Le principe de cette méthode est résumé en Annexe III

Le but de ces dosages est la sélection du métal le plus réduit par la souche D1.

3.3. Le suivi de la mesure du pH

La mesure du pH s'effectue après que l'incubation est achevée pour chaque milieu.

3.4. Détermination du poids sec

Après la filtration des milieux avec le filtre Whatman N°1, la biomasse mycélienne est récupérée à l'aide d'une spatule, est pesée et mise dans l'étuve à 28°C pour séchage et l'opération se répète chaque jour jusqu'à la stabilité du poids. Le poids sec se calcule par l'expression suivante :

$$p_s = p_0 - p_1 \left(\frac{mg}{ml} \right)$$

Avec :

p_0 : le poids du mycélium humide (initial).

P_1 est le poids de mycélium sec.

II.4 Modélisation du rendement de la réduction par la souche étudiée D1

En fonction de différents paramètres opératoires dont le temps d'incubation, la vitesse d'agitation, inoculum, et l'eau de mer, la modélisation de rendement de la réduction du métal est réalisée par un plan d'expérience de type composite centré. Les valeurs extrêmes sont regroupées dans le tableau I.

Tableau I : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés à différents niveaux

| Paramètres opératoires | Niveau - α | Niveau bas (-1) | Centre (0) | Niveau haut (+1) | Niveau + α |
|----------------------------------|----------------------|--------------------|---------------|---------------------|----------------------|
| Le temps d'incubation (jours) | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 |
| La vitesse d'agitation (rpm) | 50 | 77,5 | 105 | 132,5 | 160 |
| L'Inoculum (cylindres) | 2 | 6 | 10 | 14 | 18 |
| L'eau de mer (%) | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |

Pour accomplir ce plan d'expérience, une matrice d'expérience qui est une série d'essais, est réalisée en préparant des milieux de cultures à base de bouillon nutritif avec une

concentration du métal, qui fixée à 100 mg/L, par la suite l'ensemencement de ces milieux par des cylindres d'agar variables de la souche, incubation à 28°C sous différentes agitations.

Commençant par un plan factoriel du premier degré pour but d'évaluer les effets d'interaction des paramètres étudiés, qui comportent 16 expériences (1-16) ensuite six expériences poursuivant le model du premier degré afin de le valider (17-22) et en définitive, avec un modèle de deuxième degré, qui consiste à réaliser les essais du plan en étoile (23-30) dans le but d'optimiser les rendements.

Tableau II : Matrice d'expériences du plan composite pour quatre paramètres

| N | Le temps d'incubation (Jours) | La vitesse d'agitation (rpm) | L'inoculum (cylindres) | L'eau de mer (%) | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₄ |
|----|-------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 5 | 77,5 | 6 | 25% | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 9 | 77,5 | 6 | 25% | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 3 | 5 | 132,5 | 6 | 25% | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 4 | 9 | 132,5 | 6 | 25% | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 5 | 5 | 77,5 | 14 | 25% | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 6 | 9 | 77,5 | 14 | 25% | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 7 | 5 | 132,5 | 14 | 25% | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 8 | 9 | 132,5 | 14 | 25% | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 9 | 5 | 77,5 | 6 | 75% | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 10 | 9 | 77,5 | 6 | 75% | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 11 | 5 | 132,5 | 6 | 75% | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 12 | 9 | 132,5 | 6 | 75% | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 13 | 5 | 77,5 | 14 | 75% | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 14 | 9 | 77,5 | 14 | 75% | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 15 | 5 | 132,5 | 14 | 75% | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 9 | 132,5 | 14 | 75% | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 17 | 7 | 105 | 10 | 50% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 7 | 105 | 10 | 50% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 7 | 105 | 10 | 50% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 7 | 105 | 10 | 50% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 7 | 105 | 10 | 50% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 7 | 105 | 10 | 50% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 3 | 105 | 10 | 50% | -α | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 11 | 105 | 10 | 50% | +α | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 7 | 50 | 10 | 50% | 0 | -α | 0 | 0 |
| 26 | 7 | 160 | 10 | 50% | 0 | +α | 0 | 0 |
| 27 | 7 | 105 | 2 | 50% | 0 | 0 | -α | 0 |

| | | | | | | | | |
|-----------|---|-----|----|------|---|---|------------|------------|
| 28 | 7 | 105 | 18 | 50% | 0 | 0 | + α | 0 |
| 29 | 7 | 105 | 10 | 0% | 0 | 0 | 0 | - α |
| 30 | 7 | 105 | 10 | 100% | 0 | 0 | 0 | + α |

Notes : x_1 , x_2 , x_3 , et x_4 sont des variables centrées réduites, le temps d'incubation, la vitesse d'agitation, l'inoculum et % en eau de mer respectivement.

Chapitre II

Materiel

et

Méthodes

Dans ce chapitre, on présentons les résultats et les discussions relatifs à l'étude de l'optimisation de la réduction du cuivre par la souche d'actinomycète *Streptomyces* sp. D1 à travers la description de l'élaboration d'un modèle mathématique par le biais d'un plan composite centré.

D'autre part, il sera question de l'étude de la résistance de la souche D1 aux différents métaux lourds ainsi que de la réduction sur milieu liquide de ces derniers. Par ailleurs, la cinétique de croissance de la souche D1 sur différents milieux en présence de métaux lourds est détaillée. Suivi de l'étude des caractères morphologiques.

I. Mise en évidence de la résistance de la souche D1 aux différents métaux lourds sur milieu solide

La souche D1 a été ensemencée sur des milieux de culture à base d'agar nutritif additionnés de différents métaux lourds à une concentration de 50 mg/L dans le but de mettre en évidence leur résistance ou sensibilité à ces derniers.

L'isolat D1 a été cultivé pendant 7 jours à 28°C et les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau III suivant et illustrés dans la figure 2.

Tableau III : Croissance de la souche D1 sur des milieux Agar nutritifs additionnés de différents métaux lourds

| Milieux | NA-Cu | NA-Cr | NA-Fe | NA-Zn | NA-Cd | NA-Pb | NA-Mélange |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| La croissance | + | ++ | ++ | + | +/- | ++ | +/- |

Note : +/- : Croissance du mycélium du substrat;+ : bonne croissance; ++ : très bonne croissance.

D'après les résultats obtenus, il est clairement remarqué que l'isolat D1 présente une très bonne croissance en présence du chrome, du fer et du plomb traduisant une résistance à ces métaux. Par ailleurs, un bon développement est également enregistré en présence de cuivre et de zinc. Une faible croissance, a toutefois, été obtenue sur le milieu additionné de cadmium ainsi que le mélange de métaux lourds traduisant une sensibilité de l'isolat en présence de ces métaux.

A la lumière de ces résultats, la souche étudiée D1 présente un profil de résistance aux métaux lourds plus ou moins complet avec une différence de croissance significative dans les milieux contenant du cadmium et le mélange de métaux lourds

Ces résultats sont en accord avec l'étude effectuée par Albarracin et al., (2008) qui ont rapporté que la souche *Amycolatopsis tucumanensis* isolée à partir des sédiments pollués par le cuivre, possède la capacité de résister à une concentration de 80 mg/L de cuivre.

Par ailleurs, plusieurs études ont également rapportés, la résistance de souche appartenant au genre *Streptomyces* à de nombreux métaux lourds telles les travaux menés par polti et al., (2007) et Sanjenbam et., al (2012), et El Baz et al., (2014), qui ont rapportés des résistances de leurs souches respectivement à des concentration atteignant 100 mg/l en présence du chrome et 1800mg/l et 550 mg/l en présence de plomb respectivement.

Cependant l'isolat étudié D1 a présenté une croissance plutôt faible en développant uniquement le MS en présence de cadmium traduisant une grande sensibilité à ce dernier. Des observations similaires ont été rapportées par Schmidt A et., al (2009) pour l'espèce *Streptomyces Coelicolor* qui présentait une résistance pour l'uranium.

Schutze et Kothe, (2012), et Zhou et al., (2012), ont expliqué que le phénomène de la résistance était déjà présent dans l'ancêtre commun le plus récent, et a ensuite été transmise aux différentes lignées, d'une part et que ces dernières avaient la capacité de développer de nouveaux mécanismes ou de modifier ceux existants. Par ailleurs, les observations de ces auteurs par rapport à la capacité des espèces du genre *Streptomyces* à résister en présence de concentrations importantes de métaux lourds, est une preuve de la transmission de ce caractère à travers ces lignées.

Pour la suite de ce travail, le cuivre, le chrome, le fer, le zinc, et le plomb sont sélectionnées pour le test de réduction des métaux lourds sur milieu liquide.

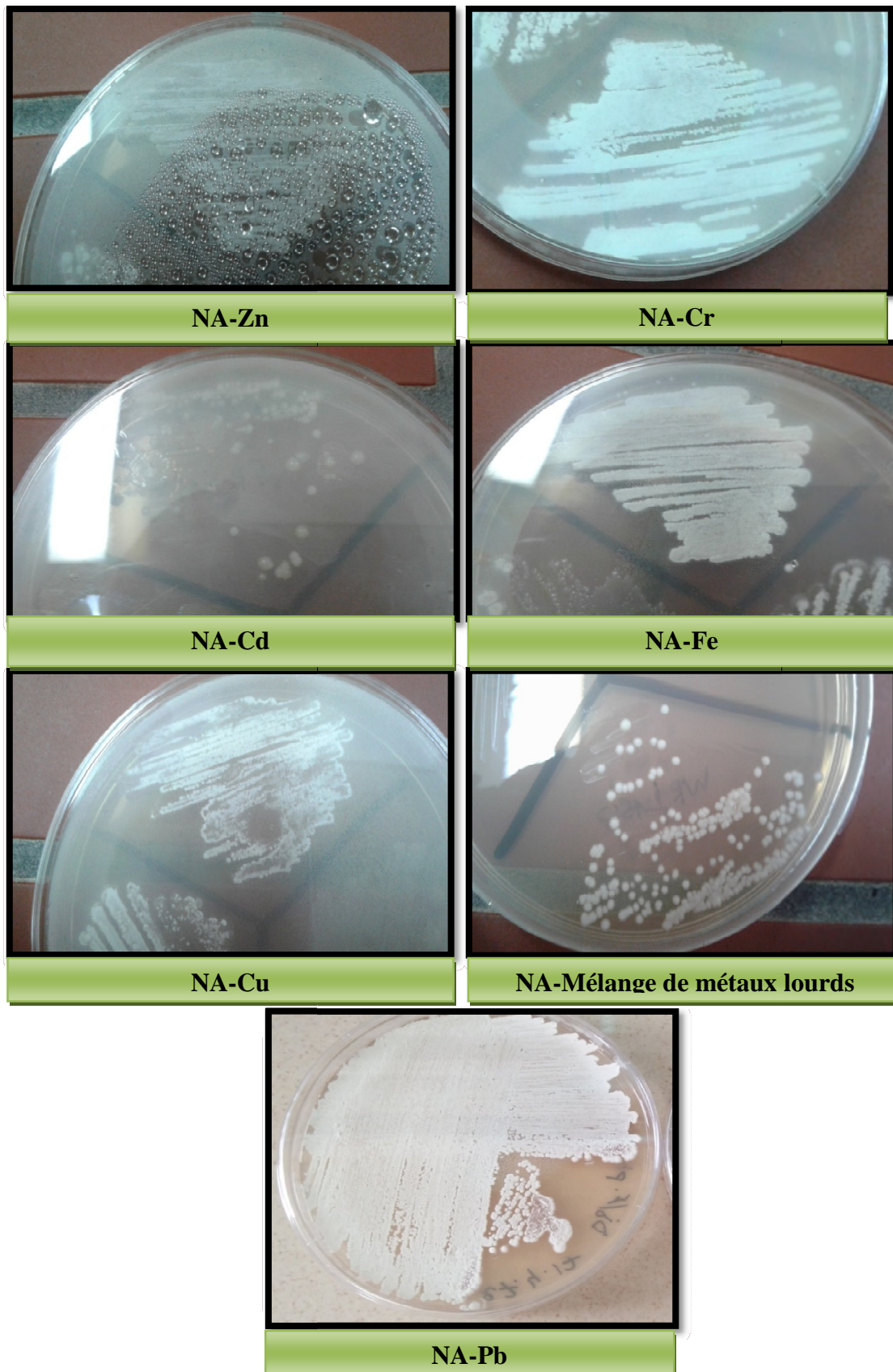


Figure 2: Mise en évidence de la résistance de la souche D1 aux métaux lourds sur milieu agar nutritif pendant 7 jours à 28°C.

II. Mise en évidence de la réduction des métaux lourds sur milieu liquide par la souche D1

Ce test a pour objectif l'étude de la capacité de la souche D1 à accumuler et à réduire les métaux lourds testés qui sont le cuivre, le fer, le chrome, le zinc et le plomb, présents dans le bouillon nutritif à raison de 50mg/l.

La figure 3 suivante montre une croissance bien claire de la souche D1 sur BN-Cr et BN-Pb et BN-Cu après incubation à 28°C pendant 7 jours.

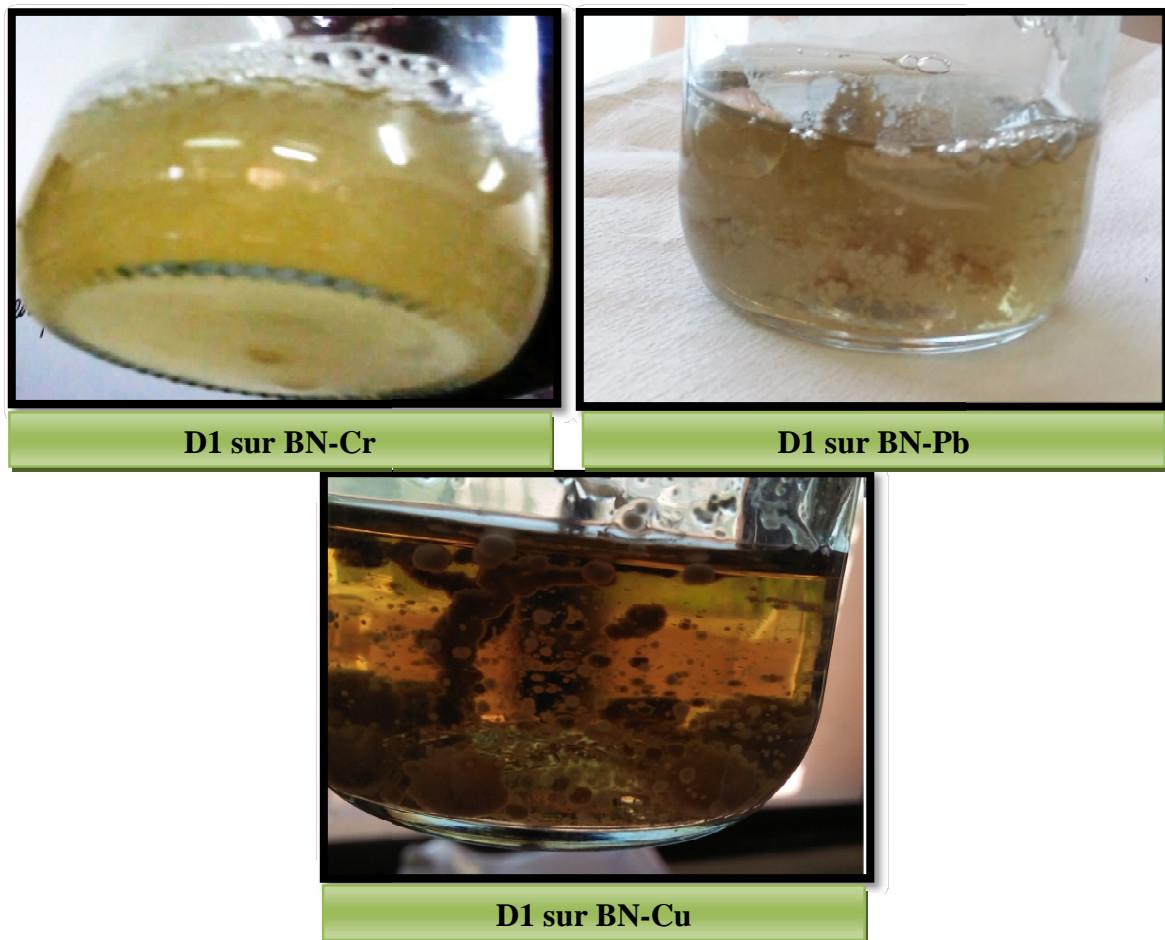


Figure 3: Croissance de la souche D1 sur les milieux BN-Cr, BN-Pb et BN-Cu respectivement.

Le dosage des métaux lourds est effectué par Spectrophotométrie d’Absorption Atomique (SAA) afin de déterminer les concentrations finales du métal dans les 4 milieux contenant l’élément considéré. Le rendement de cette réduction est donné en pourcentage par la relation suivante :

$$\varepsilon = \left(\frac{C_0 - C_f}{C_0} \right) \cdot 100$$

ε : taux de réduction du métal (%).

C_0 : Concentration initial en métal lourd.

C_f : Concentration final en métal lourd.

Les résultats obtenus sont consignés ci-dessous

Tableau IV : Rendement de réduction des métaux lourds par la souche D1

| Bouillon +métal | BN-Cu | BN-Fe | BN-Zn | BN-Pb | BN-Cr |
|-----------------|-------|--------|---------|-------|-------|
| D1 | 42% | 60,74% | 39 ,02% | - | - |

D’après les résultats obtenus, il est clairement remarqué que le maximum de réduction a été enregistré pour le fer (60,74%). Par ailleurs, les taux de réduction ont atteint des valeurs de 42% et 39,02% pour le cuivre et le zinc respectivement.

Toutefois, il est à signaler que pour des raisons de non disponibilité de l’appareil, d’une part et des produits nécessaires à la complexation du chrome, d’autre part, il ne nous a pas été possible d’effectuer les dosages du plomb et du chrome.

Ces résultats nous permettent de conclure que la souche étudiée D1 présente une très bonne capacité de réduction du fer, du cuivre et du zinc. En effet, le pourcentage de réduction du cuivre obtenu par notre souche (42%) est largement supérieur à celui obtenu par la souche *Streptomyces*sp. étudiée par Ashok et al, (2011) où le pourcentage de réduction enregistrée était de 18%. Par ailleurs, le pourcentage de réduction obtenu pour le fer (60,74%) est très important, peut être expliqué par le fait que cet élément intervient en tant que co-facteur dans de nombreux processus métaboliques tels que le transport et le stockage de l’oxygène, la régulation génétique ou encore le transfert d’électrons (Andrews et al, 2003 ; Wandersman et Delepelaire, 2004).

De nombreuses études ont été menées dans ce sens, qui ont démontrés que les actinobactéries possèdent un fort potentiel dans la réduction de métaux lourds. En effet, l'étude menée par Mattuschka et al. (1994) a apportée que *Streptomyces albus* a pu adsorber le cuivre et l'or ainsi que le plomb dans sa paroi cellulaire. De plus selon l'étude de Lin et al., (2012), *S. zinciresistens* arrive à accumulé le Zn^{2+} (26,81 mg/g) et le Cd^{2+} (85 mg/g) principalement sur la paroi cellulaire suivie d'une accumulation intracellulaire.

D'autre part, Rho et Kim, (2002) ont montré que les enveloppes de surface des cellules bactériennes peuvent adsorber divers métaux lourds au moyen de liaisons ioniques. Les groupes anioniques tels que les groupes carboxyliques et phosphate de peptidoglycane et les acides teichoïques sont considérés comme les principaux sites de liaison des métaux lourds.

Une autre étude révèle qu'une souche de *Streptomyces* produisant des sidérophores étant des métabolites secondaires étaient capable de séquestrer une gamme d'ions comprenant les ions métalliques le Mn, Co, Cd, Ni, Al, Li, Cu, Zn et Mg (Nakouti et Hobbs, 2013).

Il est ainsi possible de conclure que les actinobactéries arrivent à accumuler les métaux lourds de deux manières à savoir l'adsorption sur leur paroi cellulaire et la production de métabolite secondaire tels que les sidérophores.

III. Etude de la cinétique de croissance de la souche D1 sur différents milieux en présence de métaux lourds

III.1. Estimation du Poids sec

L'estimation de la croissance de la souche étudiée D1 a été effectuée à travers la détermination du poids sec sur différents milieux de culture additionnés du métal lourd considéré.

Après une incubation de 7 jours à 28°C, la biomasse mycélienne récupérée et pesée. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 4 ci-dessous.

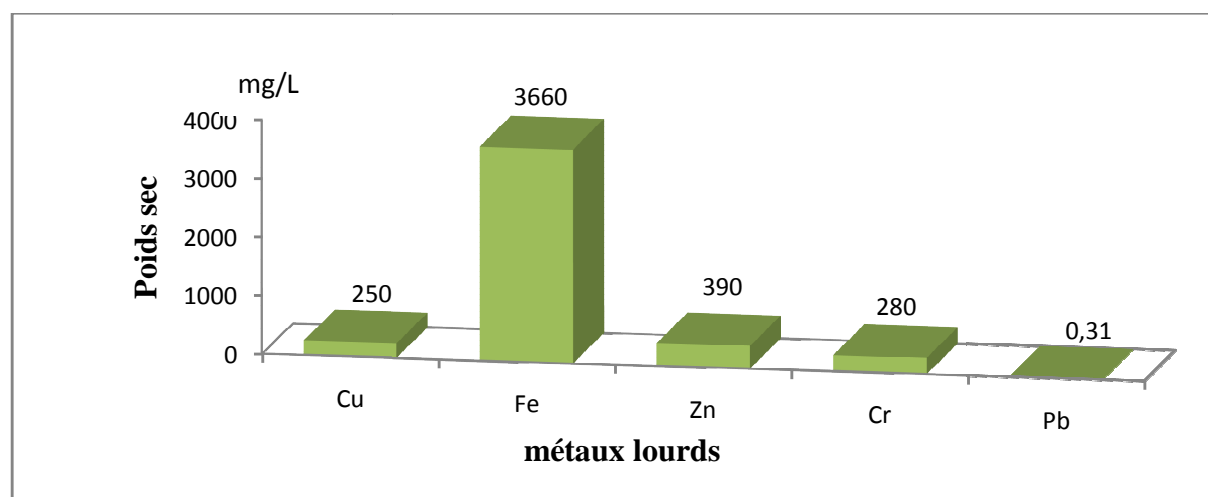


Figure 4: Variation du poids sec en fonctions de différents métaux lourds sur milieu liquide

La souche D1 présente un rendement en biomasse très important en présence de fer comme ion métallique suivi du zinc, du cuivre, du chrome et enfin du plomb avec des valeurs de 3660mg/l, 390mg/l, 280mg/l, 250mg/l et 0,31 mg/l, respectivement.

Ces résultats reflètent la capacité de la souche à réduire ces métaux selon l'ordre établi plus haut. En effet, une relation proportionnelle est observée entre le rendement de la biomasse et la réduction des métaux lourds : notamment pour l'élément fer qui confirme l'implication de ce métal comme cofacteur dans le métabolisme bactérien (Andrews et al .,2003).

Les faibles rendement en biomasse enregistrés pour le reste des métaux lourds testés (cuivre, chrome, et plomb) peuvent être expliqués par la dénaturation des protéines ou de destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire qui affectent la croissance, la morphologie et le métabolisme des microorganismes (Leita et al., 1995). En effet, de nombreuses études rapportent que la biomasse bactérienne d'un sol a tendance à diminuer suite à une contamination par un métal (Baath et al ., 1998). Les expérimentations de Sandaa et al. (1999) ont montré qu'il y a une corrélation entre la diminution du nombre des génomes bactériens et les niveaux de concentration en métaux lourds.

III.2. Suivi de l'évolution du pH après la réduction des métaux lourds

Ce test est réalisé dans le but de déterminer les valeurs de pH dans les milieux liquides additionnés des métaux lourds suivant : Cuivre, fer, zinc, chrome, plomb après 7 jours d'incubation à 28°C, que nous avons fixé à 7,3 avant l'incubation.

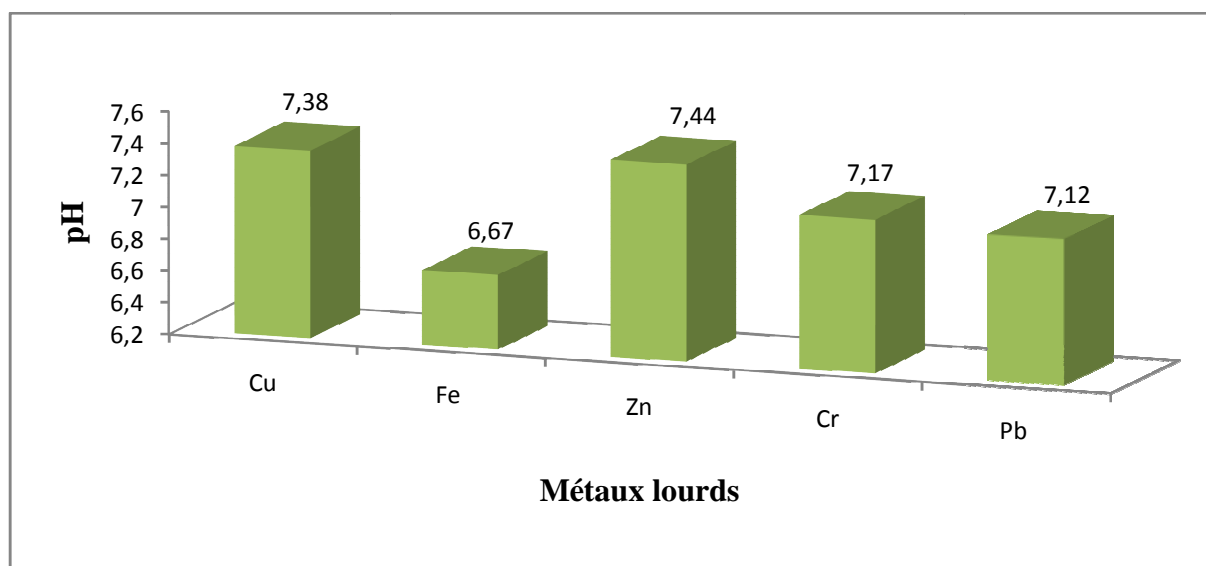


Figure 5: Variation de valeur du pH en présence de différents métaux lourds

Les valeurs de pH enregistrées (figure 4) démontrent qu'après 7 jours d'incubation, la valeur augmente légèrement en présence de zinc et de cuivre (7,44, et 7,38) respectivement, par ailleurs, une diminution est observée en présence du chrome et de plomb (7,17 et 7,12) respectivement, tandis qu'une baisse atteignant 6,67 est enregistrée en présence de fer.

D'après ces résultats, une alcalinisation du milieu est observée en présence du zinc et du cuivre, et une acidification en présence du fer, du chrome et du plomb.

Selon Boulahfrouf et al., (2008), l'acidification du milieu peut être expliquée par une importante activité métabolique éventuelles par une libération d'acides organiques.

D'autre part selon strub, (2008), l'augmentation du pH pour atteindre des valeurs légèrement basiques peut-être due à la dégradation de sources azotées présentes dans le milieu pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier induit la basification du milieu d'une part, et d'autre part, par la production des métabolites secondaires qui alcalinisent le milieu.

IV. Etude des caractères morphologiques de la souche D1

IV.1. Caractères macromorphologiques

Les propriétés culturales de l'isolat D1 cultivé sur différents milieux de cultures additionnés de métaux lourds à 28°C pendant 7 jours sont présentées dans le tableau III ci-dessous.

Tableau V : Caractéristiques macromorphologiques la souche D1 après 7 jours d'incubation à 28°C sur différents milieux en présence de métaux lourds.

| Milieux de culture | MA | MS | Pigments diffusibles | Aspect des colonies |
|--------------------|-------|--------|----------------------|--|
| NA-Cu | Beige | Marron | - | Colonies de petites tailles, rugueuses a aspect de craie |
| NA-Cr | Beige | Marron | - | Colonies de petites tailles, rugueuses a aspect de craie |
| NA-Fe | Beige | Marron | - | Colonies de petites tailles, rugueuses a aspect de craie |
| NA-Zn | Beige | Marron | - | Colonies de petites tailles, rugueuses a aspect de craie |
| NA-cd | - | Marron | - | Colonies de petites tailles, en forme de cratère |
| NA-Pb | Beige | Marron | - | Colonies de petites tailles, rugueuses a aspect de craie |
| NA-Mé | - | Marron | - | Colonies de petites tailles, en forme de cratère |

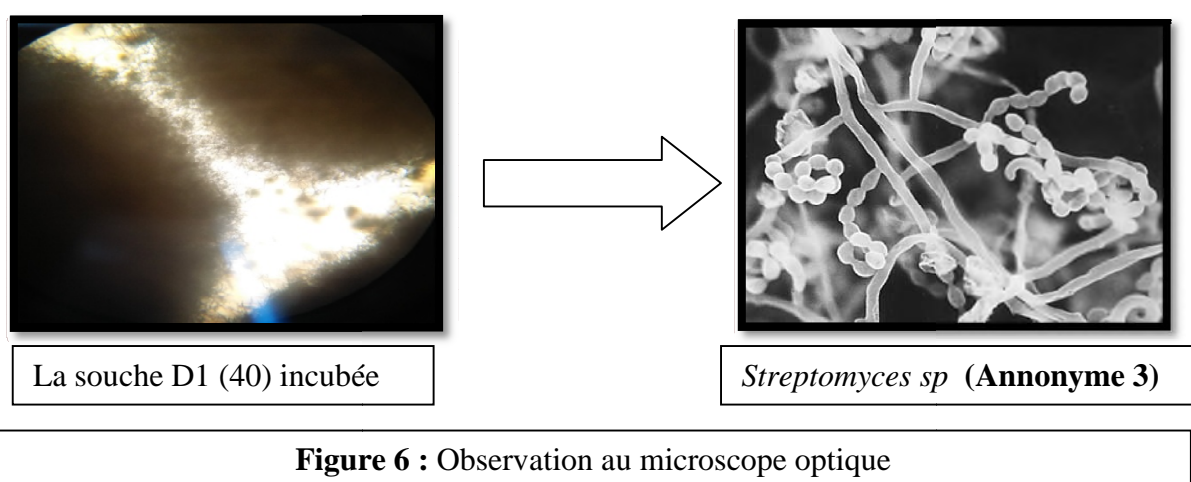
Note : - : Absence de MA et/ou Pigments diffusibles.

Les résultats démontrent que la souche D1 présente une bonne croissance sur la plupart des milieux étudiés à savoir les milieux contenant le cuivre, le chrome, le fer, le zinc et le plomb. La production du mycélium aérien (MA) est observée sur tous ces milieux, il présente une couleur beige. Cependant aucune croissance n'a été enregistrée sur les milieux contenant le cadmium et celui du mélange de métaux lourds. En effet le mycélium de substrat se manifeste par une couleur marron sur tous les milieux.

IV.2. Critères micromorphologiques

L'isolat D1 cultivé sur milieu agar nutritif, utilisé pour l'étude de la macromorphologie, est directement observée sur boîte de Pétri sous microscope optique et au grossissement (x40) après 7 jours d'incubation à 28°C.

La figure 4 suivante illustre la micromorphologie de l'isolat D1 observée au microscope optique (x40)



Les observations au microscope optique du mycélium aérien de l'isolat mettent en évidence des hyphes fins, ramifiés, non septés, présentant des chaînes de spores immobiles de forme spiralee qui se fragmentent en spores sphériques.

A la lumière des critères macro et micro morphologiques, l'isolat présente des caractéristiques typiques liés aux *Streptomycètes*, ce qui confirme leur appartenance à ce genre bactérien. Toutes ces spécificités culturelles citées plus haut renvoient au genre *Streptomyces*.

V. Modélisation du rendement de réduction du cuivre

L'étude de l'influence de quatre paramètres opératoires, à savoir le temps d'incubation (Z_1), la vitesse d'agitation (Z_2), l'inoculum (Z_3) et le pourcentage en eau de mer (Z_4), sur le rendement de réduction du cuivre (Y) par la souche D1 a été modélisée par le biais d'un plan d'expériences de type composite centré (CCD). Les valeurs ainsi obtenus de ce plan sont regroupées dans la matrice d'expérience présentée par le tableau VI. Ce plan est composé des 16 essais du plan factoriel (essai 1 à 16) et des six essais réalisés au centre du domaine (essai 17 à 22) et enfin des huit essais du plan en étoile (essai 23 à 30).

Tableau VI: La matrice d'expériences et les valeurs du rendement de réduction obtenues

| N° d'essai | Z ₁ (jour) | Z ₂ (rpm) | Z ₃ | Z ₄ (%EM) | x ₁ | x ₂ | x ₃ | x ₄ | Y (%) |
|------------|--------------------------|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------|
| 1 | 5 | 77,5 | 6 | 25 | -1 | -1 | -1 | -1 | 16,856 |
| 2 | 9 | 77,5 | 6 | 25 | +1 | -1 | -1 | -1 | 25,436 |
| 3 | 5 | 132,5 | 6 | 25 | -1 | +1 | -1 | -1 | 18,492 |
| 4 | 9 | 132,5 | 6 | 25 | +1 | +1 | -1 | -1 | 24,78 |
| 5 | 5 | 77,5 | 14 | 25 | -1 | -1 | +1 | -1 | 13,25 |
| 6 | 9 | 77,5 | 14 | 25 | +1 | -1 | +1 | -1 | 21,472 |
| 7 | 5 | 132,5 | 14 | 25 | -1 | +1 | +1 | -1 | 12,665 |
| 8 | 9 | 132,5 | 14 | 25 | +1 | +1 | +1 | -1 | 37,832 |
| 9 | 5 | 77,5 | 6 | 75 | -1 | -1 | -1 | +1 | 10,002 |
| 10 | 9 | 77,5 | 6 | 75 | +1 | -1 | -1 | +1 | 19,18 |
| 11 | 5 | 132,5 | 6 | 75 | -1 | +1 | -1 | +1 | 31,136 |
| 12 | 9 | 132,5 | 6 | 75 | +1 | +1 | -1 | +1 | 49,357 |
| 13 | 5 | 77,5 | 14 | 75 | -1 | -1 | +1 | +1 | 24,108 |
| 14 | 9 | 77,5 | 14 | 75 | +1 | -1 | +1 | +1 | 58,896 |
| 15 | 5 | 132,5 | 14 | 75 | -1 | +1 | +1 | +1 | 38,126 |
| 16 | 9 | 132,5 | 14 | 75 | +1 | +1 | +1 | +1 | 50,204 |
| 17 | 7 | 105 | 10 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 58,55 |
| 18 | 7 | 105 | 10 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 59,988 |
| 19 | 7 | 105 | 10 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 56,354 |
| 20 | 7 | 105 | 10 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 57,657 |
| 21 | 7 | 105 | 10 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 58,654 |
| 22 | 7 | 105 | 10 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 56,994 |
| 23 | 3 | 105 | 10 | 50 | -2 | 0 | 0 | 0 | 28,636 |
| 24 | 11 | 105 | 10 | 50% | +2 | 0 | 0 | 0 | 62,136 |
| 25 | 7 | 50 | 10 | 50% | 0 | -2 | 0 | 0 | 26,932 |
| 26 | 7 | 160 | 10 | 50% | 0 | +2 | 0 | 0 | 54,024 |
| 27 | 7 | 105 | 2 | 50% | 0 | 0 | -2 | 0 | 48,36 |
| 28 | 7 | 105 | 18 | 50% | 0 | 0 | +2 | 0 | 68,54 |
| 29 | 7 | 105 | 10 | 0% | 0 | 0 | 0 | -2 | 16,588 |
| 30 | 7 | 105 | 10 | 100% | 0 | 0 | 0 | +2 | 61,832 |

Les résultats du plan composite élaboré ont été traités et analysés par le logiciel MINITAB 16.0 sous Windows.

Les coefficients du model de second degrés (les effets linéaires, d'interactions et quadratiques) qui sont au nombre de 15 ont été déterminés et leurs valeurs sont regroupés dans le tableau VII.

Tableau VII : Valeurs estimés des coefficients du model (en unités codées)

| Terme | Coef | | SE Coef | T | P |
|------------------------------|--------------|------------|---------|--------|--------------|
| La constante | 60,37 | b0 | 3,398 | 17,769 | 0,000 |
| Incubation | 7,89 | b1 | 1,678 | 4,706 | 0,000 |
| Agitation | 5,31 | b2 | 1,678 | 3,168 | 0,007 |
| Inoculum | 4,24 | b3 | 1,678 | 2,525 | 0,024 |
| % EM | 8,36 | b4 | 1,678 | 4,984 | 0,000 |
| Incubation*Incubation | -6,10 | b11 | 1,570 | -3,888 | 0,002 |
| Agitation*Agitation | -7,33 | b22 | 1,570 | -4,670 | 0,000 |
| Inoculum*Inoculum | -2,84 | b33 | 1,570 | -1,807 | 0,092 |
| % EM*% EM | -7,65 | b44 | 1,570 | -4,871 | 0,000 |
| Incubation*Agitation | 0,062 | b12 | 2,055 | 0,030 | 0,977 |
| Incubation*Inoculum | 2,37 | b13 | 2,055 | 1,155 | 0,267 |
| Incubation*% EM | 0,062 | b14 | 2,055 | 0,791 | 0,442 |
| Agitation*Inoculum | -1,95 | b23 | 2,055 | -0,949 | 0,359 |
| Agitation*% EM | 2,49 | b24 | 2,055 | 1,213 | 0,245 |
| Inoculum*% EM | 3,87 | b34 | 2,055 | 1,886 | 0,08 |

VI. Analyse statistique du model

VI.1. Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

Le test de Student permet de déterminer si parmi les coefficients du modèle, il existe des coefficients non significatifs, lesquels seront éliminés de l'équation de régression car leur influence sur le rendement de réduction du cuivre par la souche D1 est négligeable.

Pour chaque coefficient, la comparaison de la valeur calculée du test de Student avec la valeur tabulée (ou en se basant sur la valeur de P) permet de vérifier sa signification. Seuls les coefficients ayant une valeur de P inférieure à 0.05 (seuil de confiance) peuvent être considérés avoir une influence sur la réponse.

D'après les résultats du tableau VII, on remarque que les coefficients significatifs sont b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , b_{11} , b_{22} et b_{44} . Les coefficients non significatifs ($P > 0,05$) sont exclus de l'équation de régression du model, qui sous réserve de validité, s'écrit :

$$\hat{Y} = 60,37 + 7,89 X_1 + 5,31 X_2 + 4,24 X_3 + 8,36 X_4 - 6,1 X_1^2 - 7,33 X_2^2 - 7,65 X_4^2 \quad (1)$$

VI.2. Analyse de variance (ANOVA)

Les résultats de l'analyse de variance obtenus par logiciel de modélisation sont rassemblés dans le tableau VIII

Tableau VIII: Résultats de l'analyse de variance

| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
|---------------------------|----|---------|---------|---------|-------|--------------|
| Main effects | 4 | 4284,1 | 4284,08 | 1071,02 | 15,85 | 0,000 |
| 2-way interactions | 6 | 533,0 | 533,02 | 88,84 | 1,31 | 0,314 |
| Courbure | 4 | 3209,0 | 3208,97 | 802,24 | 11,87 | 0,000 |
| Residual Error | 14 | 946,1 | 946,06 | 67,58 | | |
| Lack of Fit | 10 | 937,7 | 937,68 | 93,77 | 44,74 | 0,001 |
| Pure Error | 4 | 8,4 | 8,38 | 2,10 | | |
| Total | 29 | 10288,6 | | | | |

De la valeur P ($<0,05$) correspondant au test F du lack of Fit (manque d'ajustement), on peut avancer que l'équation du model postulé ne présente pas de biais, c'est à-dire que l'erreur due au model est non significative devant l'erreur aléatoire (pure error). D'une autre part, la comparaison de la variance de régression (effets principaux et quadratiques) à la variance résiduelle permet de vérifier que l'équation du model est significative.

Le coefficient de corrélation obtenu est de : $R^2 = 90,80 \%$, le model postulé est alors adéquat et explique 90.8% (R^2) des variations de la réponse et peut être utilisé pour l'optimisation de la réponse étudiée.

VI.3. Diagramme des résidus

Nous avons également présenté dans la figure 5 les variations des résidus (c'est la différence entre la valeur du rendement expérimental et prédit par le model) en fonction des valeurs prédite du rendement.

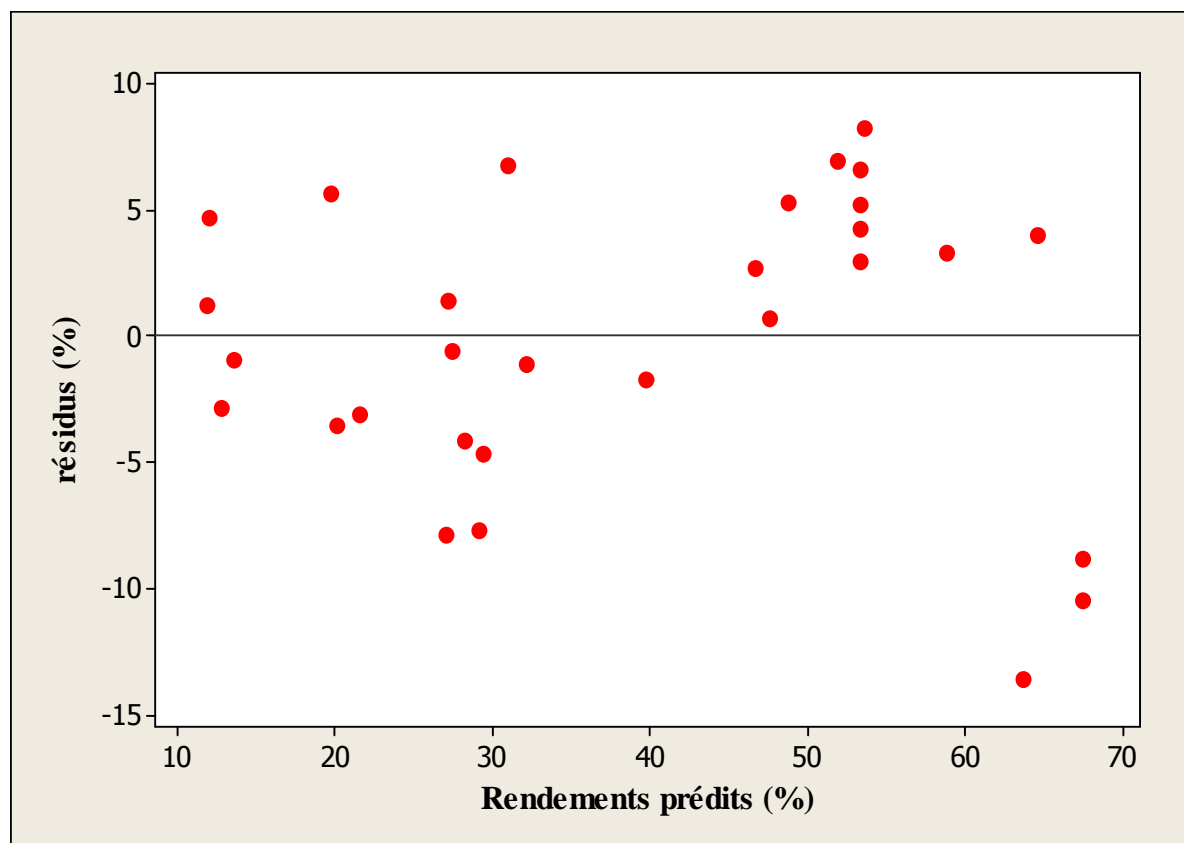


Figure 7 : Diagramme des résidus

Le diagramme des résidus ci-dessus (figure 7) ne laisse apparaître aucune relation entre les valeurs prédites et les résidus, car les points semblent disposés aléatoirement, ce qui traduit l'absence d'informations dans les résidus et que tout est expliqué par le modèle de régression obtenu. Ce résultat confirme que le modèle de second degré obtenu explique bien les résultats expérimentaux.

Le model obtenu (équation 1) montre que les quatre facteurs étudiés, à savoir, le temps d'incubation (X_1), la vitesse d'agitation (X_2), l'inoculum (X_3) et le pourcentage en EM (X_4) ont tous un effet significatif sur le rendement de réduction du cuivre par la souche D1. Le facteur qui a le plus d'influence sur la réponse est le pourcentage en EM (X_4) avec un effet positif de (+8,36). Le signe positif de ce dernier indique que la réduction du cuivre par la souche est meilleure lorsqu'on augmente le % en EM de 25% à 75 %. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par (Djinni et al., 2013) en étudiant l'influence de ce paramètre (%).

en EM) sur la croissance d'une souche *Streptomyces* sp WR1L1S8 ou l'auteur a montré que le pourcentage en EM optimal est de 50 %.

Le deuxième paramètre opératoire qui vient après le % en EM est le temps d'incubation (X_1) avec également un effet positif (+7,89). Ce résultat indique que lorsqu'on augmente le temps d'incubation de 5 jours à 9 jours, le rendement de réduction du cuivre est amélioré. On peut expliquer ce résultat par l'augmentation du temps de séjour de la souche en contact avec le milieu contenant le cuivre. Un résultat similaire a été enregistré dans l'étude de la réduction du cuivre par la souche SCA12 (Nait idir et Mahrouche., 2016) avec un effet positif de (+4,546).

La vitesse d'agitation (X_2) quant à elle a un effet positif sur le rendement (+5,31), ce qui veut dire que l'augmentation de l'agitation favorise la réduction du cuivre. D'après les travaux de la littérature (Mellouli et al., 2004), il est montré que la croissance des souches d'actinobactéries en milieu liquide est favorisée à des vitesses d'agitation allant jusqu'à 250 rpm pour conditionner la bonne aération de la souche.

Enfin, le facteur d'inoculum (X_3) a également un effet positif sur la réponse (+4,24), ce qui montre que le rendement de réduction du cuivre augmente lorsqu'on augmente l'inoculum de 6 à 10 disques. D'après les travaux de Couillard et al., (1991), les plus hauts pourcentages de réduction du cuivre (68% Cu) sont atteints avec 30% d'inoculum par rapport à 20% (50% Cu).

On ne note toutefois aucune interaction entre les différents facteurs opératoires considérés.

VII. Optimisation du rendement de réduction du cuivre

L'étape de l'optimisation a pour intérêt la détermination des valeurs optimales des quatre paramètres étudiés à savoir : le temps d'incubation, la vitesse d'agitation, l'inoculum et le pourcentage en eau de mer ; conduisant à un meilleur rendement de réduction du cuivre. C'est le tracé des courbes isoréponses ou des surfaces de réponses qui permet de localiser la région du domaine d'étude où cet optimum apparaît, ainsi que toutes les conditions opératoires menant à ce dernier. Ces courbes sont tracées par le logiciel Minitab16.0.

La première étape à réaliser pour atteindre l'objectif de l'optimisation consiste à dériver le modèle prédictif par rapport à chacune des variables x_1 , x_2 , x_3 et x_4 :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1} = 7,89 - 12,2x_1 = 0 \\ \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_2} = 5,31 - 14,66x_2 = 0 \\ \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_3} = 4,24 = 0 \\ \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_4} = 8,36 - 15,3x_4 = 0 \end{array} \right.$$

La résolution du système d'équations conduit à :

$$\left\{ \begin{array}{l} x_1 = 0,65; \\ x_2 = 0,36; \\ x_3 \text{ inconnu} \\ x_4 = 0,54 \end{array} \right.$$

La deuxième étape consiste à tracer les courbes isoréponse et des surfaces de réponse dans le plans x_1 - x_4 (les facteurs les plus significatifs) pour $x_2=0,36$ à différents niveaux de x_3 (-2, 0, +2).

La figure 6 ci - dessous montre une surface de réponse obtenue en traçant (à l'aide de Mintab 16.0) le rendement dans le plan x_1 et x_4 (temps d'incubation et % en EM) et en fixant la variable $x_2 = 0,36$ (la vitesse d'agitation de 114,9 rpm) et la variable $x_3 = -2$ (l'inoculum de 2).

La forme parabolöide de cette surface suggère qu'il existe un rendement maximal unique donné par les coordonnées du sommet de cette surface.

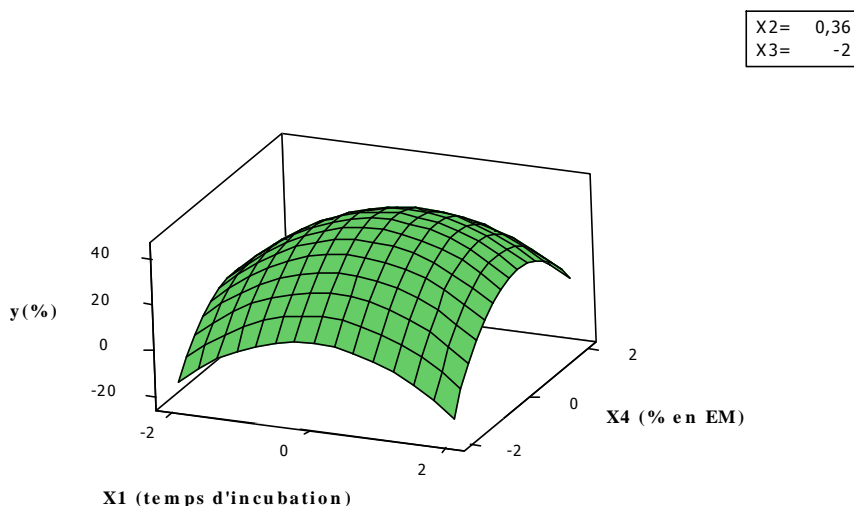
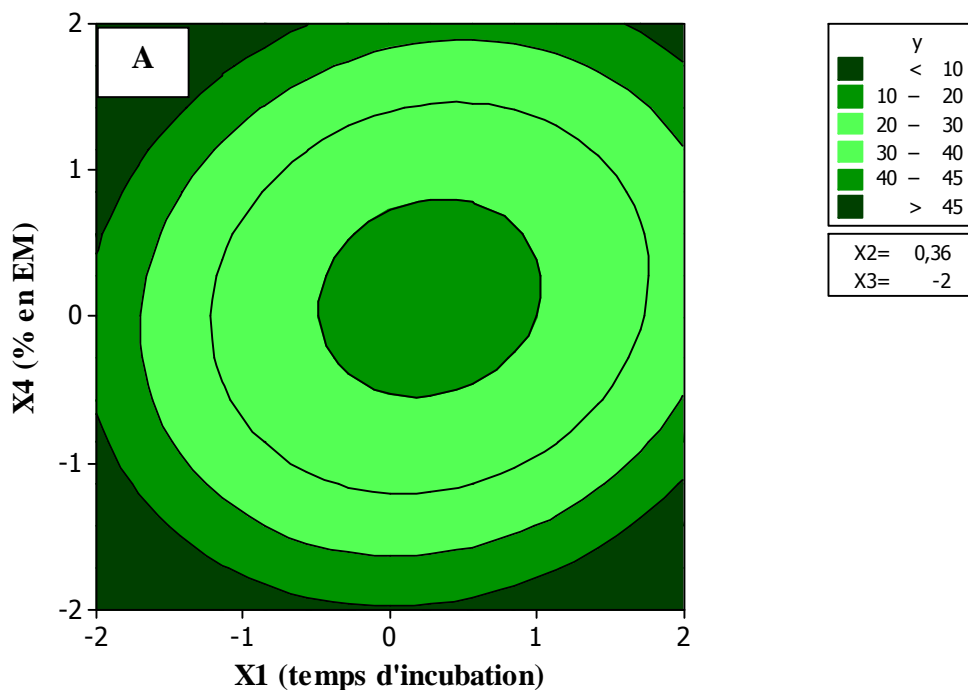


Figure 8 : Surface de réponses pour $x_2= 0,36$ et $x_3= -2$

Le tracé des isoréponses pour trois niveaux de la variable x_3 (-2 ; 0 ; 2) permet de prédire la valeur maximale du rendement et de visualiser le déplacement de la zone délimitant l'optimum en fonction des conditions opératoires.



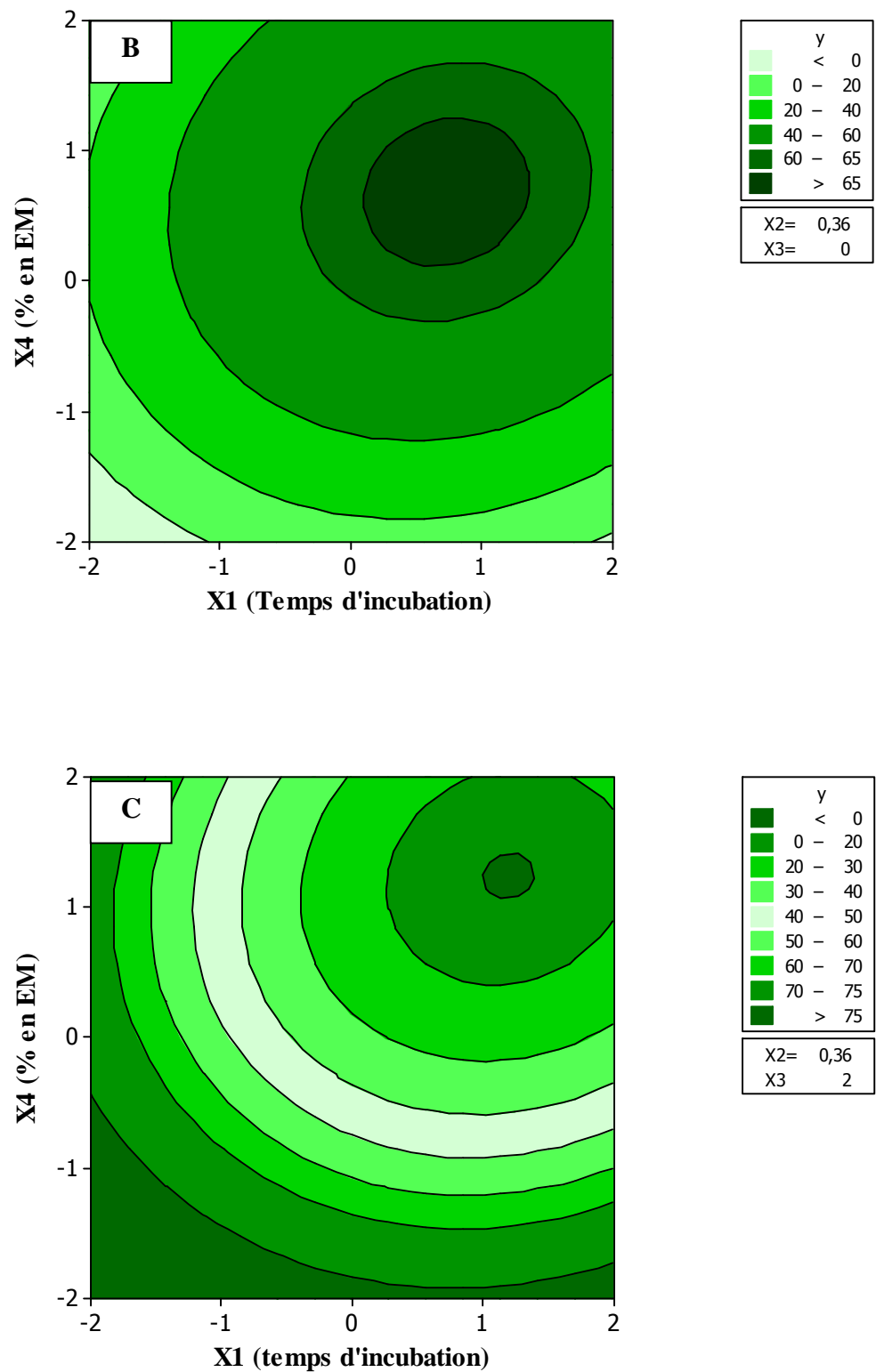


Figure 9 : Les courbes isoréponses pour différents niveaux de x_3

L'analyse de ces figures montrent que pour une vitesse d'agitation optimale (**114,9 %**), ($x_2= 0,36$), le rendement de réduction augmente avec l'augmentation de l'inoculum en passant d'un rendement de 45 % à $x_3= -2$ pour 2 inoculum (figure 7-A) à un rendement de 65 % à $x_3=0$ pour 10 inoculum (figure 7-B) enfin un rendement de 75% à $x_3=2$ pour 18 inoculum (figure 7-C).

Le rendement optimal déterminé par le logiciel Minitab 16.0 est de 75.25%

$x_1= 1.19$ (correspondant à un temps d'incubation de 9 jours) ;

$x_2= 0.3$ (correspondant à une vitesse d'agitation de 113,25 rpm) ;

$x_3 = 2$ (correspondant à l'inoculum avec 18 disques) ;

$x_4 = 1.23$ (correspondant en pourcentage en EM qui est de 80,75 %)

Pour transformer les variables centrées réduites (x_j) aux variables naturelles nous avons appliqué la formule de passage ou de codage suivante (Ozil et al., 1997)

$$X_j = \frac{Z_j - Z_j^\circ}{\Delta Z_j}, j = 1, 2, \dots, k$$

Avec :

$$Z_j^\circ = \frac{Z_{jmax} + Z_{jmin}}{2} \text{ et } \Delta Z_j = \frac{Z_{jmax} - Z_{jmin}}{2}$$

x_j est la variable centrée réduite correspond à Z_j .

Le point de coordonnée ($Z_j^\circ, Z_j^\circ, \dots, Z_k^\circ$) est dénommé centre du plan ; ΔZ_j est l'unité ou intervalle de variation suivant l'axe des Z_j , Z_{jmin} et Z_{jmax}

Prenons l'exemple du l'inoculum ; d'où $X_3= 2$

$$Z_2 = (X_2 \cdot \Delta Z_2) + Z_2^\circ$$



$$Z_2 = (0,36.27, 5) + 105$$

$$Z_2 = 114,9 \text{ rpm}$$

Conclusion

L'accumulation des métaux lourds dans l'environnement peut se répercuter sur la santé des êtres humains et des animaux. Le développement de techniques efficaces pour décontaminer les sites pollués est devenu indispensable. L'une de ces techniques, la bioremédiation, en utilisant des microorganismes,

En effet l'objectif visé par ce travail est l'optimisation du rendement d'un métal le plus réduit par la souche *Streptomyces*. D1 d'origine tellurique et marine en utilisant les plans d'expériences.

L'évaluation de la résistance ou de la sensibilité de l'isolat D1, a été étudiée sur différents milieux de cultures solides à bases d'agar nutritif additionné de métaux lourds à savoir le cuivre, le zinc, le fer, le chrome, le plomb, le cadmium, et le mélange des six métaux à raison de 50 μ g /mL.

La souche D1 a montrée une bonne croissance sur différents milieux de culture solide comportant les métaux lourds, trois sélectionnés (Zn, Cu, et Fe) pour le test de la réduction sur milieu liquide.

Cette seconde étude réalisée a fin d'évaluer le rendement de réduction des métaux lourds sélectionnés sur milieu liquide en utilisant la spectroscopie d'absorption atomique (SAA).

La souche D1 a présenté un pourcentage de réduction intéressant à la fois sur le fer (60,74%), le cuivre (42%), et le zinc (39,02%). Sur la base de ce résultat, nous avons opté pour la réduction du cuivre par la souche D1 et suivre le pourcentage de la réduction de ce dernier.

Par ailleurs, l'identification morphologique de l'isolat D1 a été entreprise en utilisant un microscope optique. Les résultats obtenus ont permis de rattacher la souche au genre *Streptomyces*, où le nom *Streptomyces* sp. D1 lui a été attribué.

Une modélisation statistique a été entrepris par le biais d'un plan d'expériences composite centré en vue de déterminer l'effet des paramètres opératoires étudiés (temps d'incubation, vitesse d'agitation, l'inoculum, et pourcentage en eau de mer) sur le rendement de réduction du cuivre par la souche D1 ainsi que leur optimisation.

Le modèle de second degré développé par l'application d'un plan composite centré montre que le paramètre opératoire qui a le plus d'influence sur le rendement de réduction du

cuiivre est le pourcentage en EM (80,75 %), suivi du temps d'incubation avec également un effet positif, ce résultat indique que lorsqu'on augmente le temps d'incubation, le rendement de réduction du cuiivre est amélioré, l'effet de la vitesse d'agitation et l'inoculum sont également positifs donc leur augmentations favorise la réduction du cuiivre.

Le tracé des surfaces de réponse et les courbes isoréponses a révélé l'existence d'un rendement maximum de réduction du cuiivre qui est de 75.25% en fonction des quatre paramètres étudiés. Leurs valeurs optimales sont :

- $x_1 = 1.19$ (correspondant à un temps d'incubation de 9 jours) ;
- $x_2 = 0.3$ (correspondant à une vitesse d'agitation de 114,9 rpm) ;
- $x_3 = 2$ (correspondant à l'inoculum avec 18 disques) ;
- $x_4 = 1.23$ (correspondant en pourcentage en EM qui est de 80,75 %)

Toutefois, il ressort de l'intérêt de poursuivre les investigations au tour des axes suivants:

- Il est souhaitable de tester l croissance de la souche étudiée sur d'autres milieux de culture que le NA (agar nutritif) tel que le milieu Mincer.
- Suivre le rendement de la réduction des métaux en fonction d'autres facteurs opératoires.
- coupler le traitement biologique des métaux lourds avec d'autres procédés comme les traitements physico-chimiques et électrochimiques.
- Vérifier l'optimum en rendement de réduction (75,25%) théorique à celui expérimental.

Référence bibliographique

A

- Albarracin V. H., Winik B., Kothe E., Amoroso M.J., and Abate C.M. Copper bioaccumulation by the actinobacterium *Amycolatopsis* sp. AB0. *Journal of Basic Microbiology*, (2008); 48(5): 323–330.
- Amoroso M.J., Castro G.R., Carlino F.J., Romero N.C., Hill R.T and Oliver G. Screening of heavy metal-tolerant actinomycetes isolate from the Salí River. *Journal Gene Applied Microbiology*, (1998); 44 : 129–132.
- Anderews S.C., Robinson A.K., Quinones R.F. Bacterial iron homeostasis. *Fems Microbiology Review*, (2003); 27: 215-237.
- Ashok K., Bisht B.S., Joshi V.D. Bioremediation potential of three acclimated bacteria with reference to heavy metal removal from waste *International Journal of Environmental Sciences*, (2011); 2 (2) : 896.

B

- Baath E., Diaz-Ravna M., Frostegård A and Campbell C.D. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied Environmental Microbiology*, (1998); 64 : 238-245.
- Badji B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat es-Sciences naturelles, option : Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, pp, 12-16.
- Bakour L. (2006). Caractérisation chimique de nouvelles mutactimycines Synthétisées par *Saccharothrix* sp SA103 et influence des sources de carbone et azote sur la production. Mémoire de Magister de Microbiologie Appliquée, Université Abderrahmane Mira de Bejaia. pp. 4-9.
- Benson D.R., Silvester W.B. Biology of *Frankia* strain, actinomycetes symbiont of actinorrhizal plants. *Microbiological Reviews*, (1993); 57:293-319.
- Boopathy R. Factors bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, (2000); 74 (1), 63–67.
- Boulahfrouf A., Reghioua S., Boughachiche F., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., et

Références bibliographiques

Boudemagh A. Séparation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques Produits par une souche représentative d'actinomycète isolée de sol aride de la région de Biskra. *Sciences et Technologie*, (2008); 28: 59-64.

- Bruins M. R., Kapil S and Oehme F.W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2000); 45:198-207.

C

- Colombié V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.
- Cooksey D. Molecular Mechanisms of Copper Resistance and Accumulation in Bacteria. *Fems Microbiology Reviews*, (1994). 14: 381-386.
- Couillard D., Chartier M., Mercier G .(1991). Optimisation de la solubilisation biologique des métaux lourds dans les boues aérobies en mode cuvée. Rapport scientifique 348 Université du Québec (INRS-Eau), Québec.

D

- Daboor S.M., Amany M.H., Neven AbdELfatah E., and Hanouna S.I. Heavy metal adsorption of *Streptomyces chromofuscus* *Journal C.L. Medical*, (2014); 2(6):431-437.
- Dgigal D. (2003). Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorrhiziens) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse de doctorat : université Cheikh Anta Diop De Dakar. pp. 157.
- Djinni I., Defant A., Kecha M., Mancini I. (2013). *Streptomyces* sp. WR1L1S8, actinomycète endophyte d'origine marine : Isolement, criblage, identification et étude du profil métabolique. Les journées internationales de biotechnologie. 21-24 décembre 2013, Hammamet (Tunisie).
- Dommergues Y., Mangenot F. (1970). *Ecologie microbienne du sol*, Masson et Cie. France.
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., et Stackebrandt E. (2013). *The prokaryotes*, 3^e édition, volume 3, *A Handbook on the Biology of Bacteria: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, edition Springer, USA. (c)

E

- El-Shatoury S., Mitchell J., Bahgat M., Dewedar A. Biodiversity of Actinomycetes in a Constructed Wetland for Industrial Effluent Treatment, *Actinomycetologica*. (2004); 18 (1): 1-7.
- Elekwachi C.O., Andresen J., Hodgman T.C. Global use of bioremediation technologies for decontamination of ecosystems. *Journal BioremedialBiodegradation*, (2014), 5 : 1–9.
- Emerson R.L.P., Reis I.S., Kassawara M.M and Lucio J.A.A. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz Journal Infections Diseases*, (2012); 16(5): 466-471.
- Ensign J.C., Normand p., Burden J.P., Yallop C.A. Physiology of some actinomycetes genera, *Reviews. Microbiology*, (1993); 144: 657-660.
- Eunice J.A., Prosser J.I. Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *Journal of geneticmicrobiology*, (1983) ; 129 : 2029-2036.
- El Baz S., Baz M., Barakate M., Hassani L., El Gharmali A., and Imziln B. Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by Actinobacteria Isolated from Abandoned Mining Areas, *the Scientific World Journal*, (2014) ; Volume 2015, Article ID 761834.

G

- Goodfellow M., Kämpfer P ., Busse H.J., Trujillo M. E., Suzuki K., Ludwig W and Whitman W B.(2012). *BERGEY'S MANUAL Systematic Bacteriology .The Actinobacteria*, Part A and B, Volume Five Second Edition: springer, USA , pp: 29,33,35,36,42,114.
- Goodfellow M., Williams S.T. Ecology of actinomycètes. *Annuals Review of Microbiology*, (1983); 37:189-216.
- Goupy J. (1999). *PLANS D'EXPERIENCES POUR SURFACES DE REPONSE. EDITION DUNOD, Paris.* pp 3,5,14, 253.
- Goupy J. Les Plans d'expériences, *Reviews. MODULAD*, (2006); 34: 97.

H

- Holzapfel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K.D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P.S., Teniola D and AddoPBacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone. *PCT International Applied*. (2002); pp: 19.
- Hamedi J., Dehghani M., Mohammddipanah F. Isolation of Extremely Heavy Metal Resistant Strains of Rare Actinomycetes from High Metal Content Soils in Iran. *International Journal Environmental. Research*, (2015); 9(2):475-480.

Références bibliographiques

I

- Ishizawa S., Araragi M. (1976). Composition of actinomycetes population in soil. In: Actinomycetes, the boundary microorganisms. Arai T. Edition: Toppan Co. Ltd, Tokyo, PP: 97-107.

K

- Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri-Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, pp15-17.
- Küster E., Williams S .T. (1964). Sélection of media for isolation of streptomycetes. Nature, London.

L

- Leita L., De Nobili M., Muhlbachova G., Mondini C., Marchiol L., and Zerbi G. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biological Fertil. Soils*, (1995); 19 : 103-108.
- Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- Lam K. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, current opinion in *Microbiology*, (2006); 9 : 245-251.
- Larpent J.P., Sanglier J.J. (1989). *Biotechnologies des antibiotiques*. Masson. Paris, pp. 481.
- Larpent J.P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens Tec et Doc, Lavoisier paris.
- Lin Y., Wang X., Wang B., Mohamad O., and Wei G. Bioaccumulation characterization of zinc and cadmium by *Streptomyces zinc iresistens*, a novel actinomycete, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2012); 77: 7–17.

M

- Madigan M.T., Martinko J.M and Parker J. (1997). *Biology of microorganisms*. Printice, Hall International Inc, New York. pp 164-147.
- Mattuschka B., Straube G., and Trevors J.T. Silver, copper, lead and zinc accumulation by *Pseudomonas stutzeri* AG259 and *Streptomyces albus*: electron microscopy and energy dispersive X-ray studies, *BioMetals*, (1994); 7(2) : 201–208

Références bibliographiques

- Mills A.L., Colwell R.R. Microbiological effects of metal ion in Chesapeake Bay and sediments. *Bull. Environmental Contamination Toxicology*, (1977); 18 :99-103.
- Mellouli., Ben Amer M.R., SIOUD S., Salem M., Bejar S. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in microbiology.*, (2003); 154 :345- 352.
- Murray P.R., Baron E.J., Tenover J.C., Tenover F.C. (2003). *Manual of clinical microbiology*, 8th edition. American society for Microbiology, Washington.

N

- Nakouti and G. Hobbs. A new approach to studying ion uptake by actinomycetes, *Journal of Basic Microbiology*, (2013); 53(11): 913–916.
- Nait Idir N., Mahrouche N. (2016). Optimisation du rendement de réduction du cuivre par une souche d'actinomycète par le biais d'un plan composite centré. Mémoire .master. Université A. Mira-Bejaia. pp 29.
- Nriagu J O. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, (1989); 338: 47-49.

O

- O'Gara F., Dowling D.N., Boesten B. (2008). *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs*. John Wiley and Sons: Weinheim. pp: 192.
- Ouhdouch Y. (2003). Actinomycètes. Premier atelier national du réseau NAFRINNET-MAROC, institut scientifique 23-24/10/2003, Semlalia, Marrakech.
- Ozil P. (1997). Plans d'expériences : méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie et d'Electrometallurgie INPG.
- Ozturk A., Artan T. and Ayar A. Biosorption of nickel (II) and copper (II) ions from aqueous solution by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal Colloids and Surfaces*, (2004); 34 (2):105-111.

P

- Peraud O. (2006). Isolation and characterization of a sponge-associated actinomycete that produces manzamines. Dissertation submitted to the Faculty of Graduate School of the University of Maryland.
- Perry J.J., Staley J.T. et Lory S. (2004). *Microbiologie. Cours et questions de révision*. Dunod, Paris, pp. 494-369.

Références bibliographiques

- Polti M. A., Amoroso M. J., and Abate C. M. Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments, *Chemosphere*, (2007); 67(4): 660–667.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003). Microbiologie, 2^e édition de Boeck, Bruxelles. pp 546
- Prescott L. M., Harley J.P., Klein D.A., Wiley J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. (2010). Microbiologie, 3^e édition de Boeck .Bruxelles. PP 589.

R

- Rho J.Y., Kim J.H. Heavy metal biosorption and its significance to metal tolerance of streptomycetes, *The Journal of Microbiology*, (2002); 40(1): 51–54.

S

- Saffroy S (2006). Etude du Métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse Doctorat, Institut Polytechnique de lorraine, France : pp 6-14
- Sandaa R.A., Torsvik V., Enger O., Daae F.L., Castberg T., Hahn D. Analysis of bacterial communities in heavy metal contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecologically*, (1999); 30: 237-251.
- Sanjenbam P., Saurav K., and Kannabiran K. Biosorption of mercury and lead by aqueous *Streptomyces VITSVK9* sp. Isolated from marine sediments from the bay of Bengal, India, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, (2012); 6(2): 198–202,
- Schmidt G., Haferburg U., Lischke et al. Heavy metal resistance to the extreme: *Streptomyces* strains from a former uranium mining area, *Chemie der Erde, Geochemistry*, (2009); 69 (2): 35–44.
- Schutze E. and Kothe E. (2012). Bio-geo interactions in metal contaminated soils, in *Soil Biology*, E. Kothe and A. Varma, Editions., vol.31, Springer, Berlin, Germany, pp : 163–182.
- Selvin J., Priya S.S., Kiran G.S., Thangavelu T and Bai N.S. Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. *Microbiology Research*, (2009); 164 (3) : 352-363.
- Siddiquee S., Rovina K., Al Azad S., Naher L., Suryani S and Chaikaew. Heavy Metal Contaminants Removal from Wastewater Using the Potential Filamentous Fungi Biomass *Journal MicrobBiochemical Technolgy*, (2015); 7(6): 384-393.

Références bibliographiques

- Srivastava N.K., Majumder C.B. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal Hazard Mater*, (2008); 151 (1): 1-8.
- Strub C. (2008). Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université Toulouse. France, pp 52.

V

- Verma V.C., Gond S.K., Kumar A., Mishra A., Kharwar R. N and Gange A. C. Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Jus: Isolation, Diversity, and Anti-Microbial activity. *Microbiology Ecology*, (2009); 57: 749-756.

W

- Wandersman C., Delepelaire P. Bacterial iron sources: From Siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, (2004); 58: 611-647.
- Weyland H. (1986). Actinomycetes of the bottom sediments of various seas. GERBAM. Deuxième Colloque International de Bactériologie marine. CNRS, Brest, 1-5 octobre 1984 Ifremer, Actes de Colloques , 3, pp.73-79.

Z

- Zermane F. (2007). Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Thèse de doctorat. Université Toulouse. France, pp :33-38.
- Zhou M., Jing X., Xie P. et al. Sequential deletion of all the polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic gene clusters and a 900-kb subtelomeric sequence of the linear chromosome of *Streptomyces coelicolor*, *FEMS Microbiology Letters*, (2012); 333(2): 169–179
- Zouboulis A.I., Loukidou M.X and Matis K.A. biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal polluted soils. *Process Biochemistry*, (2004);39: pp 909-916.

Les sites web :

Références bibliographiques

- **Anonyme1:** [http //www .fsr .ac.ma/Cours /chimie/EI% 20hajji/chap% 20 IV% 20S4.Pdf](http://www.fsr.ac.ma/Cours/chimie/EI%20hajji/chap%20IV%20S4.Pdf). (consulté le 28/04/2017).
- **Anonyme2:** nte-serveur-univ-
yon1.Fr /pfcsp /repencp/spectroabsorption /Spectroabsorption texte .html. (consulté le 28/04/2017).
- **Anonyme3 :**<http://www.actino.jp/DigitalAtlas1/subwin.cgi?section=7&fig=19>. (consulté le 03/07/2017).

Annexes

Annexe I : Matériel analytique

- Autoclave (ALFA-10-Plus)
- Anse de platine
- Bain marie agitateur (memmert)
- Balance analytique (RADWAG)
- Barreaux magnétique
- Bécher
- Bec bunsen
- Boîte de Pétri de 99mm
- Entonnoir
- Emporte pièce
- Erlenmeyers
- Etuve à 28°C(memmert)
- Filtre à seringue
- Filtre Whatman
- Fiole jaugée (50ml)
- Flacons (200ml)
- Four pasteur (TRADE Raypa)
- Microscope optique (optika).
- Micropipette de 1000 μ L (DRAGONLAB)
- pH- mètre (BANTE instruments)
- SAA (ASC-6000.SHIMADZU)
- Spatule
- Tubes à essai

Annexe II : Milieux d'isolement

I. Milieu SCA (Starch Casein Agar) (Kuster et Williams, 1964)

- Amidon : 10g,
- Caséine : 0,3g, KNO₃ : 2g, K₂HPO₄ : 2g, NaCl : 2g, MgSO₄, 7H₂O : 0,05 g, CaCO₃ : 0,02g, FeSO₄, 7H₂O : 0,01g,
- Agar: 18g, H₂O d : qsp 1000 ml, pH 7,2 ±0.

II. Milieu NA (Nutrient Agar) (Murray et al., 2003)

- Digestion pancréatique de gelatin : 5 g
- Extrait de boeuf : 3g
- Gélose : 15g

Annexe III : Spectrophotométrie d'absorption atomique

L'absorption atomique de flamme est une méthode qui permet de doser essentiellement les métaux en solution. Cette méthode d'analyse élémentaire impose que la mesure soit faite à partir d'un analyte (élément à doser) transformé à l'état d'atomes libres. L'échantillon est porté à une température de 2000 à 3000 degrés pour que les combinaisons chimiques dans lesquelles les éléments sont engagés soient détruites. La spectrométrie d'absorption atomique est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie de l'atome.

L'analyse par absorption atomique utilise la loi de Beer- Lambert, permet de mesurer les concentrations des éléments à doser qui est comme suit : (Anonyme 1 28/04/2017)

$$\log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon . L . C$$

Avec :

I₀ : Intensité de la radiation incidente ;

I : Intensité de la radiation après absorption ;

ε: coefficient d'absorption spécifique de l'élément à doser ;

C : Concentration de l'élément à doser ;

L : Longueur du trajet dans la flamme contenant l'élément à doser.

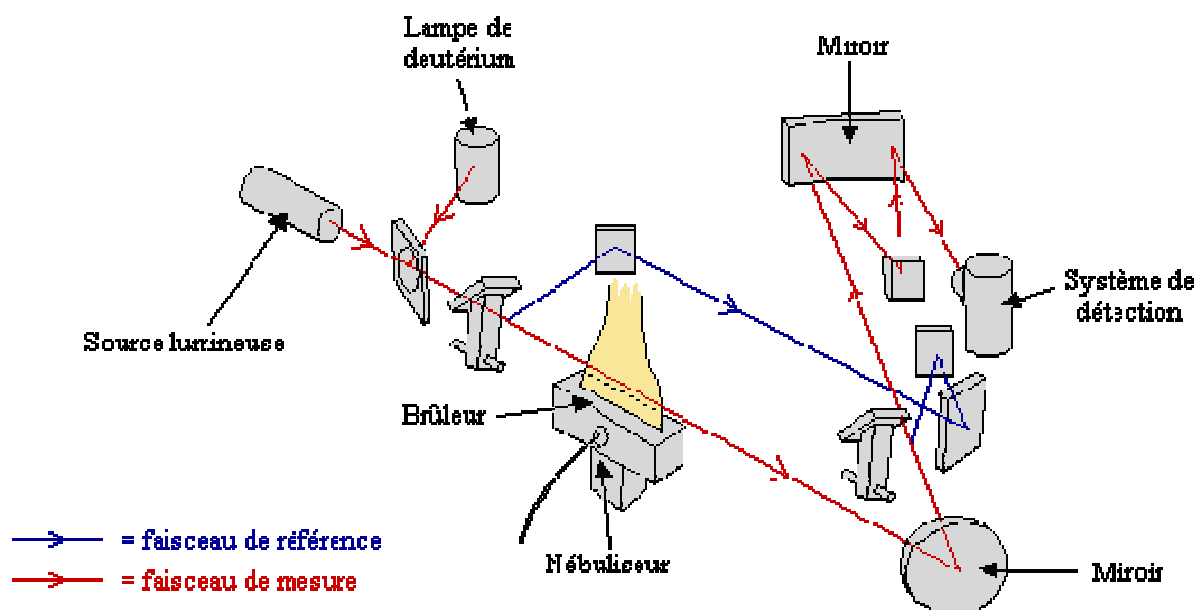


Figure 1: Schéma du principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre d'absorption atomique (anonyme 2, 28/04/2017)

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose :

La lampe à cathode creuse (source)

La source de lumière qui produit une radiation caractéristique de l'élément à doser à la longueur d'onde λ , quand un atome absorbe l'énergie à partir de cette source, un électron passe de l'état fondamental à un état moins stable « état excité ». En retournant à l'état fondamental, un photon d'énergie lumineuse est émis avec une intensité proportionnelle à la concentration de l'élément à analyser.

Le nébuliseur

L'échantillon à analyser est en solution. Celle-ci est aspirée au moyen d'un capillaire par le nébuliseur. A l'orifice du nébuliseur, du fait de l'éjection d'un gaz à grande vitesse, il se crée une dépression. La solution d'analyse est alors aspirée dans le capillaire et à la sortie, elle est pulvérisée en un aérosol constitué de fines gouttelettes. Cet aérosol pénètre alors dans la chambre de nébulisation dont le rôle est de faire éclater les gouttelettes et d'éliminer les plus grosses. Le brouillard homogène pénètre alors dans le brûleur.

La flamme-atomisation

L'aérosol pénètre dans le brûleur puis dans la flamme air acétylène. Au bout d'un certain parcours au seuil de la flamme, le solvant de la gouttelette est éliminé, il reste les sels ou particules solides qui sont alors fondus, vaporisés puis atomisés.

Monochromateur

Le rôle du monochromateur consiste à éliminer toute la lumière, quelle que soit son origine, ayant une longueur d'onde différente de celle à laquelle on travaille.

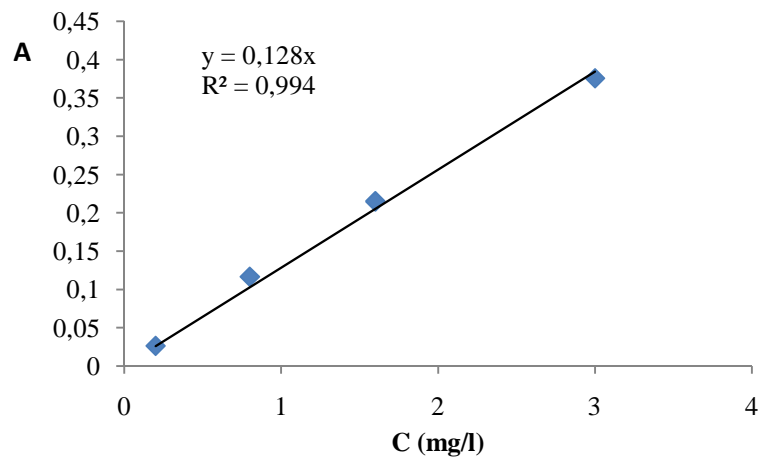
Le détecteur

Son rôle est de mesurer les intensités lumineuses nécessaires au calcul des absorbances, il est couplé à un système électrique pour enregistrer et traiter les signaux.

Annexe IV : Les courbes d'étalonnage

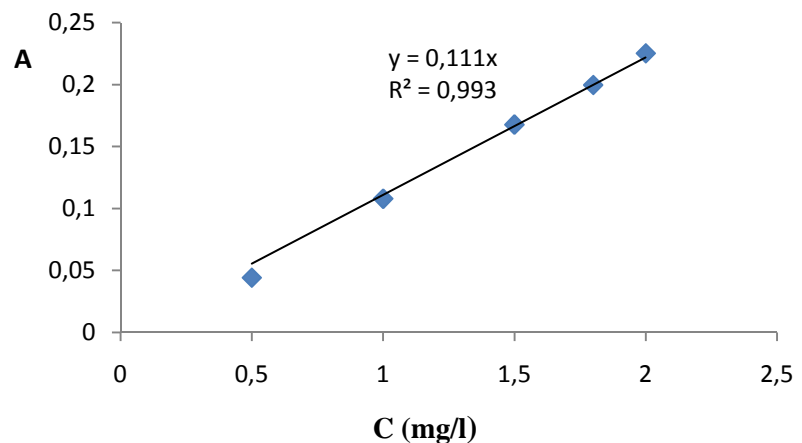
Nos analyses ont été effectuées sur un spectrophotomètre de marque SHIMADZU de type AA6500 assisté par micro-ordinateur. L'appareil est préalablement étalonné avant analyse en faisant passer des solutions étalons. Pour s'assurer de la linéarité de la courbe d'étalonnage, des étalons ont été préparés dans la gamme de concentrations bien déterminée pour chaque métal. L'exploitation de la courbe d'étalonnage tracée en portant l'absorbance en fonction de la concentration (figure ci dessous) est assurée par l'ordinateur. Cette exploitation sert à déterminer la concentration en cuivre, en zinc et en fer des échantillons à analyser

| Concentration C (mg/l) | Absorbance A |
|---------------------------|-----------------|
| 0.2 | 0.0264 |
| 0.8 | 0.1165 |
| 1.6 | 0.2149 |
| 3 | 0.3755 |



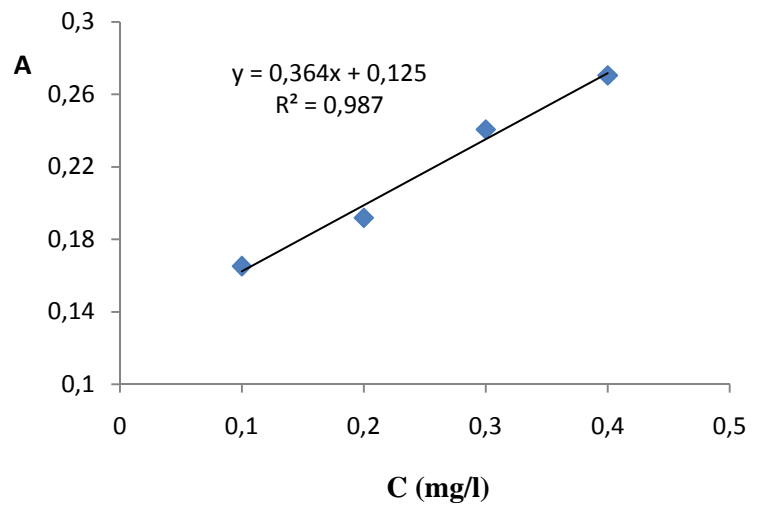
Courbe d'étalonnage du cuivre

| Concentration C (mg/l) | Absorbance A |
|---------------------------|-----------------|
| 0.5 | 0.0443 |
| 1 | 0.1080 |
| 1.5 | 0.1678 |
| 1.8 | 0.1998 |
| 2 | 0.2253 |



Courbe d'étalonnage du fer

| Concentration (mg/l) | Absorbance A |
|----------------------|--------------|
| 0.1 | 0.1651 |
| 0.2 | 0.1919 |
| 0.3 | 0.2406 |
| 0.4 | 0.2705 |



Courbe d'étalonnage du Zinc

Annexe V :

Table de Student (Goupy ; 1999 et Ozil ; 1997)

| Unilatéral Bilatéral | 0.01 0.20 | 0.05 0.10 | 0.025 0.05 | 0.01 0.02 | 0.005 0.01 |
|-------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| 1 | 3,08 | 6,31 | 12,7 | 31,8 | 63,7 |
| 2 | 1,89 | 2,92 | 4,30 | 6,97 | 9,92 |
| 3 | 1,64 | 2,35 | 3,18 | 4,54 | 5,84 |
| 4 | 1,53 | 2,13 | 2,78 | 3,75 | 4,60 |
| 5 | 1,48 | 2,02 | 2,57 | 3,37 | 4,03 |
| 6 | 1,44 | 1,94 | 2,45 | 3,14 | 3,71 |
| 7 | 1,42 | 1,90 | 2,37 | 3,00 | 3,50 |
| 8 | 1,40 | 1,86 | 2,31 | 2,90 | 3,36 |
| 9 | 1,38 | 1,83 | 2,26 | 2,82 | 3,25 |
| 10 | 1,37 | 1,81 | 2,23 | 2,76 | 3,17 |
| 11 | 1,36 | 1,80 | 2,20 | 2,72 | 3,10 |
| 12 | 1,36 | 1,78 | 2,18 | 2,68 | 3,06 |
| 13 | 1,35 | 1,77 | 2,16 | 2,65 | 3,01 |
| 14 | 1,35 | 1,76 | 2,15 | 2,62 | 2,98 |
| 15 | 1,34 | 1,75 | 2,13 | 2,60 | 2,95 |
| 16 | 1,34 | 1,75 | 2,12 | 2,58 | 2,92 |
| 17 | 1,33 | 1,74 | 2,11 | 2,57 | 2,90 |
| 18 | 1,33 | 1,73 | 2,10 | 2,55 | 2,88 |
| 19 | 1,33 | 1,73 | 2,09 | 2,54 | 2,86 |
| 20 | 1,33 | 1,73 | 2,09 | 2,53 | 2,85 |
| 21 | 1,32 | 1,72 | 2,08 | 2,52 | 2,83 |
| 22 | 1,32 | 1,72 | 2,07 | 2,51 | 2,82 |
| 23 | 1,32 | 1,71 | 2,07 | 2,50 | 2,81 |
| 24 | 1,32 | 1,71 | 2,06 | 2,49 | 2,80 |
| 25 | 1,32 | 1,71 | 2,06 | 2,49 | 2,79 |
| 26 | 1,32 | 1,71 | 2,06 | 2,48 | 2,78 |
| 27 | 1,31 | 1,70 | 2,05 | 2,47 | 2,77 |
| 28 | 1,31 | 1,70 | 2,05 | 2,47 | 2,76 |
| 29 | 1,31 | 1,70 | 2,05 | 2,46 | 2,76 |
| 30 | 1,31 | 1,70 | 2,04 | 2,46 | 2,75 |
| 40 | 1,30 | 1,68 | 2,02 | 2,42 | 2,70 |
| ∞ | 1,28 | 1,65 | 1,96 | 2,33 | 2,58 |

Annexe VI :

Table de Fisher (Goupy, 1999 et Ozil, 1997)

Valeurs des 95^{èmes} centiles (niveaux 0.05)

F0.95 pour la distribution F

| v_1 → v_2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 15 | 20 | 24 | 30 | ∞ |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
| 1 | 161 | 200 | 216 | 225 | 230 | 234 | 237 | 239 | 241 | 242 | 244 | 246 | 248 | 249 | 250 | 254 |
| 2 | 18.5 | 19.0 | 19.2 | 19.2 | 19.3 | 19.3 | 19.4 | 19.4 | 19.4 | 19.4 | 19.4 | 19.4 | 19.4 | 19.4 | 19.5 | 19.4 |
| 3 | 10.1 | 9.55 | 9.28 | 9.12 | 9.01 | 8.94 | 8.89 | 8.85 | 8.81 | 8.79 | 8.74 | 8.7 | 8.66 | 8.64 | 8.62 | 8.53 |
| 4 | 7.71 | 6.94 | 6.59 | 6.39 | 6.26 | 6.16 | 6.09 | 6.04 | 6.0 | 5.96 | 5.91 | 5.86 | 5.80 | 5.77 | 5.75 | 5.63 |
| 5 | 6.61 | 5.79 | 5.41 | 5.19 | 5.05 | 4.95 | 4.88 | 4.82 | 4.77 | 4.74 | 4.68 | 4.62 | 4.56 | 4.53 | 4.50 | 4.37 |
| 6 | 5.99 | 5.14 | 4.76 | 4.53 | 4.39 | 4.28 | 4.21 | 4.15 | 4.10 | 4.06 | 4.00 | 3.94 | 3.87 | 3.84 | 3.81 | 3.67 |
| 7 | 5.59 | 4.74 | 4.35 | 4.12 | 3.97 | 3.87 | 3.79 | 3.73 | 3.68 | 3.64 | 3.57 | 3.51 | 3.44 | 3.41 | 3.38 | 3.23 |
| 8 | 5.32 | 4.46 | 4.07 | 3.84 | 3.69 | 3.58 | 3.50 | 3.44 | 3.39 | 3.35 | 3.28 | 3.22 | 3.15 | 3.12 | 3.08 | 2.93 |
| 9 | 5.12 | 4.26 | 3.86 | 3.63 | 3.48 | 3.37 | 3.29 | 3.23 | 3.18 | 3.14 | 3.07 | 3.01 | 2.94 | 2.90 | 2.86 | 2.71 |
| 10 | 4.96 | 4.10 | 3.71 | 3.48 | 3.33 | 3.22 | 3.14 | 3.07 | 3.02 | 2.98 | 2.91 | 2.85 | 2.77 | 2.74 | 2.70 | 2.54 |
| 11 | 4.84 | 3.98 | 3.59 | 3.36 | 3.20 | 3.09 | 3.01 | 2.95 | 2.90 | 2.85 | 2.79 | 2.72 | 2.65 | 2.61 | 2.57 | 2.40 |
| 12 | 4.75 | 3.89 | 3.49 | 3.26 | 3.11 | 3.00 | 2.91 | 2.85 | 2.8 | 2.75 | 2.69 | 2.62 | 2.54 | 2.51 | 2.47 | 2.30 |
| 13 | 4.67 | 3.81 | 3.41 | 3.18 | 3.03 | 2.92 | 2.83 | 2.77 | 2.71 | 2.67 | 2.60 | 2.53 | 2.46 | 2.42 | 2.38 | 2.21 |
| 14 | 4.60 | 3.74 | 3.34 | 3.11 | 2.96 | 2.85 | 2.76 | 2.7 | 2.65 | 2.60 | 2.53 | 2.46 | 2.39 | 2.35 | 2.31 | 2.13 |
| 15 | 4.54 | 3.68 | 3.29 | 3.06 | 2.90 | 2.79 | 2.71 | 2.64 | 2.59 | 2.54 | 2.48 | 2.40 | 2.33 | 2.29 | 2.25 | 2.07 |
| 16 | 4.49 | 3.63 | 3.24 | 3.01 | 2.85 | 2.74 | 2.66 | 2.59 | 2.54 | 2.49 | 2.42 | 2.35 | 2.28 | 2.24 | 2.19 | 2.01 |
| 17 | 4.45 | 3.59 | 3.20 | 2.96 | 2.81 | 2.70 | 2.61 | 2.55 | 2.49 | 2.45 | 2.38 | 2.31 | 2.23 | 2.19 | 2.15 | 1.96 |
| 18 | 4.41 | 3.55 | 3.16 | 2.93 | 2.77 | 2.66 | 2.58 | 2.51 | 2.46 | 2.41 | 2.34 | 2.27 | 2.19 | 2.15 | 2.11 | 1.92 |
| 19 | 4.38 | 3.52 | 3.13 | 2.90 | 2.74 | 2.63 | 2.54 | 2.48 | 2.42 | 2.38 | 2.31 | 2.23 | 2.16 | 2.11 | 2.07 | 1.88 |
| 20 | 4.35 | 3.49 | 3.10 | 2.87 | 2.71 | 2.60 | 2.51 | 2.45 | 2.39 | 2.35 | 2.28 | 2.20 | 2.12 | 2.08 | 2.04 | 1.84 |
| 21 | 4.32 | 3.47 | 3.07 | 2.84 | 2.68 | 2.57 | 2.49 | 2.42 | 2.37 | 2.32 | 2.25 | 2.18 | 2.10 | 2.05 | 2.01 | 1.81 |
| 22 | 4.30 | 3.44 | 3.05 | 2.82 | 2.66 | 2.55 | 2.46 | 2.40 | 2.34 | 2.30 | 2.23 | 2.15 | 2.07 | 2.03 | 1.98 | 1.78 |
| 23 | 4.28 | 3.42 | 3.03 | 2.80 | 2.64 | 2.53 | 2.44 | 2.37 | 2.32 | 2.27 | 2.20 | 2.13 | 2.05 | 2.01 | 1.96 | 1.76 |
| 24 | 4.26 | 3.40 | 3.01 | 2.78 | 2.62 | 2.51 | 2.42 | 2.36 | 2.30 | 2.25 | 2.18 | 2.11 | 2.03 | 1.98 | 1.94 | 1.73 |
| 25 | 4.24 | 3.39 | 2.99 | 2.76 | 2.60 | 2.49 | 2.40 | 2.34 | 2.28 | 2.24 | 2.16 | 2.09 | 2.01 | 1.96 | 1.92 | 1.71 |
| 26 | 4.23 | 3.37 | 2.98 | 2.74 | 2.59 | 2.47 | 2.39 | 2.32 | 2.27 | 2.22 | 2.15 | 2.07 | 1.99 | 1.95 | 1.9 | 1.69 |
| 27 | 4.21 | 3.35 | 2.96 | 2.73 | 2.57 | 2.46 | 2.37 | 2.31 | 2.25 | 2.2 | 2.13 | 2.06 | 1.97 | 1.93 | 1.88 | 1.67 |
| 28 | 4.20 | 3.34 | 2.95 | 2.71 | 2.56 | 2.45 | 2.36 | 2.29 | 2.24 | 2.19 | 2.12 | 2.04 | 1.96 | 1.91 | 1.87 | 1.65 |
| 29 | 4.18 | 3.33 | 2.93 | 2.70 | 2.55 | 2.43 | 2.35 | 2.28 | 2.22 | 2.18 | 2.10 | 2.03 | 1.94 | 1.90 | 1.85 | 1.64 |
| 30 | 4.17 | 3.32 | 2.92 | 2.69 | 2.53 | 2.42 | 2.33 | 2.27 | 2.21 | 2.16 | 2.09 | 2.01 | 1.93 | 1.89 | 1.84 | 1.62 |
| 40 | 4.08 | 3.23 | 2.84 | 2.61 | 2.45 | 2.34 | 2.25 | 2.18 | 2.12 | 2.08 | 2.00 | 1.92 | 1.84 | 1.79 | 1.74 | 1.51 |
| 60 | 4.00 | 3.15 | 2.76 | 2.53 | 2.37 | 2.25 | 2.17 | 2.10 | 2.04 | 1.99 | 1.92 | 1.84 | 1.75 | 1.70 | 1.65 | 1.39 |
| 120 | 3.92 | 3.07 | 2.68 | 2.45 | 2.29 | 2.18 | 2.09 | 2.02 | 1.96 | 1.91 | 1.83 | 1.75 | 1.66 | 1.61 | 1.55 | 1.25 |
| ∞ | 3.84 | 3.00 | 2.60 | 2.37 | 2.21 | 2.10 | 2.01 | 1.94 | 1.88 | 1.83 | 1.75 | 1.67 | 1.57 | 1.52 | 1.46 | 1.0 |

 v_1 degrés de liberté au numérateur v_2 degrés de liberté au dénominateur

Résumé

La souche d'actinobactéries étudiée dans ce travail nommée *Streptomyces* sp. D1 appartient à la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) a fait l'objet de la mise en évidence de la résistance ou de la sensibilité vis-à-vis les métaux lourds (cuivre, zinc, chrome, cadmium, fer, plomb) ainsi que leur aptitude à les réduire.

La souche D1 a montrée une bonne croissance sur différents milieux de culture solides comportant les métaux lourds, trois sont sélectionnés (Zn, Cu, et Fe) pour le test de réduction sur milieu liquide avec une concentration de 50mg/L en métal, un pH de 7,3 et l'incubation à 28°C pendant 7 jours sous agitation de 125 rpm.

Les résultats du test de réduction de la souche D₁ nous a permis d'optimiser le rendement de réduction du métal le plus réduit qui est le cuivre. Pour cela, un plan d'expériences de type composite centré à été appliqué afin d'étudier l'influence de quatre paramètres opératoire sur le rendement de réduction du cuivre à savoir : le temps d'incubation, la vitesse d'agitation, l'inoculum et le pourcentage en eau de mer.

Le tracé des courbes iso-réponses nous a permis d'obtenir les valeurs optimales des quatre paramètres étudiés avec un temps d'incubation de 9 jours, une vitesse d'agitation 114,9 rpm, l'inoculum de 18 disques et un pourcentage en l'eau de mer de 80,75%, ces valeurs optimales de ces paramètres nous a conduit à un meilleur rendement de 75.25%.

Mots clés : Actinobactéries, Métaux lourds, bioremédiation, plan d'expériences, plan composite centré, optimisation.

Abstract

The strain of actinobacteria studied in this work is named *Streptomyces* sp. D1 belongs to the collection of the Laboratory of Applied Microbiology (LMA), has been demonstrated resistance or sensitivity to some heavy metals (copper, zinc, chromium, cadmium, iron, lead) and their ability to reduce them.

The strain D1 showed good growth on different solid culture media containing heavy metals, three of them were selected (Zn, Cu, and Fe) for the reduction test on liquid medium with a concentration of 50mg / L of metal, pH of 7.3 and incubation at 28 °C for 7 days with stirring of 125 rpm.

The reduction test results the D1 strain allowed us to optimize the reduction yield of the copper. For this purpose, central composite design has been applied to study the influence of four operating parameters on the copper reduction yield, namely: incubation time, agitation speed, inoculum and the percentage of sea water.

Iso-response curve plot allowed us to obtain the optimal values of the four parameters studied: incubation time of 9 days, a stirring speed of 114.9 rpm, an inoculum of 18 disks and a Seawater percentage of 80.75%. These optimal values factors led us to the best yield of 75.25%.

Keywords: Actinobacteria, Heavy metals, bioremediation, design of experiments, central composite design, optimization.