

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITÉ BLIDA 1
FACULTÉ DE TECHNOLOGIE
DÉPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES**



**MEMOIRE DE MASTER
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER**

Filière:

GENIE DES PROCÉDES

Option:

GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Par: BOUSSOUBEL LEILA

Ingénieur d'Etat en Chimie Industrielle de l'Université Saad DAHLEB de Blida

**ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES COLORANTS
AZOÏQUES ET ANTHRAQUINONIQUES PAR DES
BACTERIES ISOLEES DE LA BETTERAVE ROUGE**

Soutenu le 24/06/2015 devant le Jury composé de:

Président: Dr. BOUZID Bachir

Professeur: UNIVERSITE BLIDA 1

Examineurs:

Dr. LARIBI Hassiba

MCA UNIVERSITE BLIDA 1

Dr. BENMAAMAR Zoubir

MCA UNIVERSITE BLIDA 1

Promoteur: Dr. BOUTOUMI Hocine

MCA UNIVERSITE BLIDA 1

Co- Promotrice: Mme. TALEB Fella

Ingénieur: UNIVERSITE BLIDA 1

Promotion 2015

Avant-propos

Ce travail, fruit d'une année d'efforts, a été réalisé au laboratoire de chimie, département de biologie, à l'université Blida 1.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon responsable de recherche Monsieur Dr. BOUTOUMI Hocine, maître de conférences A à l'université Blida1, pour m'avoir permis de diriger mes travaux de cette recherche. Je le remercie également pour ces précieux conseils, et surtout sa disponibilité.

Je remercie Monsieur le Pr. Bouzid Bachir, Professeur à l'université Blida 1, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury et qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Dr. LARIBI Hassiba, maître de conférences A à l'université Blida1 et Monsieur Dr. BENMAAMAR Zoubir, maître de conférences A à l'université Blida1, d'avoir accepté d'être membre de jury et de m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

Ma reconnaissance va à Madame la co-promotrice TALEB Fella, doctorante et ingénieur de laboratoire au département de biologie, à l'université Blida 1, pour ses discussions scientifiques menant souvent à des conclusions convaincantes.

Je demeure, néanmoins, sensible au soutien de chacun.

Table de notation

Abréviation	Signification
DL50	Dose létale 50 ;
T	Température ;
pH	<i>Potentiel hydrogène ;</i>
DBO5	Demande biochimique en oxygène ;
DCO	Demande chimique en oxygène ;
X	Concentration en biomasse bactérienne par unité de volume de culture ;
X₀	Concentration cellulaire au temps $t = 0$;
μ :	Taux de croissance ;
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide ;
HPLC	Chromatographe liquide à haute performance ;
CI	Chromatographe ionique ;
DO	Densité optique ;
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique ;
I₀	L'intensité lumineuse du rayon incident ;
I₁	L'intensité du rayon transmis en l'absence de biomasse ;
I₂	L'intensité du rayon transmis en présence de biomasse ;
d	Longueur du trajet optique ;
α	un coefficient de proportionnalité ;
V	Vitesse de la réaction à une vitesse de substrat ;
V_{max}	Vitesse maximum à une concentration de substrat ;
K_m	Constante MICHAELIS ;
MO	Méthyl Orange ;
MSA	Acide méthanosulfonique ;
S	Souche.
JORA	Journal Officiel de la République Algérienne

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure I.1 Domaines d'absorption des quelques couleurs.....	04
Figure I.2 Structure chimique des colorants azoïques.....	04
Figure I.3 Structure chimique des colorants diazoïques dissymétriques.....	05
Figure I.4 Structure chimique des colorants anthraquinonique.....	06
Figure I.5 Structure chimique des colorants indigoïdes.....	06
Figure I.6 Structure chimique des colorants xanthènes.....	07
Figure I.7 Structure chimique des phtalocyanines.....	07
Figure I.8 Structure chimique des colorants nitrés et nitrosés.....	07
Figure I.9 Structure chimique des colorants triphénylméthanes.....	08
Figure I.10 Conséquences de la bioaccumulation après déversement de substances toxiques (insecticides) dans un cours d'eau.....	09

CHAPITRE II

Figure II.1 les phases de croissance établies par Buchanan (1918).....	20
Figure II.2 Evaluation de la matière organique et de la biomasse en présence d'une culture bactérienne.....	22
Figure II.3 Technique de traitement sur boîte de pétri.....	24
Figure II.4 Technique turbidimétrique de mesure de la biomasse.....	24

CHAPITRE III

Figure III.1 Schéma pour définir la densité optique du milieu.....	38
Figure III.2 Schéma de l'absorbance.....	39

CHAPITRE IV

Figure IV.1 les 4 souches sur GN.....	42
Figure IV.2 S1 sur GN.....	42
Figure IV.3 S2 sur GN.....	42
Figure IV.4 S3 sur GN.....	42
Figure IV.5 S4 sur GN.....	42
Figure IV.6 S4 sur GN (pré identification).....	42
Figure IV.7 Coloration de Gram de la souche 1.....	43
Figure IV.8 Coloration de Gram de la souche 2.....	43
Figure IV.9 Coloration de Gram de la souche 3.....	43
Figure IV.10 Coloration de Gram de la souche 4.....	43
Figure IV.11 Api 20E avant incubation.....	44
Figure IV.12 Api 20E après incubation.....	44
Figure IV.13 Variation du taux de biodégradation du méthyle orange par les 4 souches	47

bactériennes en fonction du temps.....	
Figure IV.14 Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du méthyle orange par les 4 souches bactériennes en fonction du temps.....	47
Figure IV.15 Variation du pH au cours de la biodégradation du méthyle orange par les 4 souches bactériennes en fonction du temps.....	48
Figure IV.16 Variation du taux de biodégradation du colorant rouge par les 4 souches bactériennes en fonction du temps.....	49
Figure IV.17 Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge par les 4 souches bactériennes en fonction du temps.....	49
Figure IV.18 Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant rouge par les 4 souches bactériennes en fonction du temps.....	50
Figure IV.19 Variation du taux de biodégradation du colorant bleu par les 4 souches bactériennes en fonction du temps.....	51
Figure IV.20 Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant bleu par les 4 souches bactériennes en fonction du temps.....	52
Figure IV.21 Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant bleu par les 4 souches bactériennes en fonction du temps.....	52
Figure IV.22 Variation du taux de biodégradation du méthyle orange par la S4 en fonction du temps.....	54
Figure IV.23 Variation du pH au cours de la biodégradation du méthyle orange par la S4 en fonction du temps.....	54
Figure IV.24 Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du méthyle orange par la S4 en fonction du temps.....	55
Figure IV.25 Variation du taux de biodégradation du colorant rouge par la S4 en fonction du temps.....	55
Figure IV.26 Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant rouge par S4 en fonction du temps.....	56
Figure IV.27 Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge par la S4 en fonction du temps.....	56
Figure IV.28 Variation du taux de biodégradation du colorant bleu par la S4 en fonction du temps.....	57
Figure IV.29 Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant bleu par S4 en fonction du temps.....	57
Figure IV.30 Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant bleu par la S4 en fonction du temps.....	58
Figure IV.31 Variation du taux de biodégradation du colorant rouge Congo par la S4 en fonction du temps en milieu acide.....	59
Figure IV.32 Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant rouge Congo par S4 en fonction du temps en milieu acide.....	59
Figure IV.33 Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge Congo par la S4 en fonction du temps en milieu acide.....	60
Figure IV.34 Chromatogramme (HPLC) standard du MO.....	60
Figure IV.35 Chromatogramme du MO après la biodégradation.....	61
Figure IV.36 Chromatogramme (HPLC) standard du colorant Rouge Congo avant la biodégradation.....	61

Figure IV.37 Chromatogramme (HPLC) du colorant rouge Congo après la biodégradation.....	62
Figure IV.38 Chromatogramme (HPLC) standard du colorant Bleu Cibacete avant la biodégradation.	62
Figure IV.39 Chromatogramme (HPLC) du colorant Bleu Cibacete après la biodégradation.....	63
Figure IV.40 Chromatogramme standard du bleu cibacette pour la détermination des anions....	64
Figure IV.41 Chromatogramme standard du bleu cibacette pour la détermination des cations...	64
Figure IV.42 Chromatogramme après la biodégradation du bleu cibacette pour la détermination des anions.....	64
Figure IV.43 Chromatogramme après la biodégradation du bleu cibacette pour la détermination des anions.....	65
Figure IV.44 Chromatogramme standard colorant rouge pour la détermination des anions.....	66
Figure IV.45 Chromatogramme standard colorant rouge pour la détermination des cations.....	66
Figure IV.46 Chromatogramme après la biodégradation du colorant rouge pour la détermination des anions.....	66
Figure IV.47 Chromatogramme (CI) après la biodégradation du colorant rouge pour la détermination des cations.....	67
Figure IV.48 Chromatogramme (CI) standard du MO pour la détermination des cations.....	67
Figure IV.49 Chromatogramme standard du MO pour la détermination des anions.....	68
Figure IV.50 Chromatogramme après la biodégradation MO pour la détermination des anions	68
Figure IV.51 Chromatogramme après la biodégradation MO pour la détermination des cations.	68

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau I.1	Classement des colorants selon leur structure chimiques	04
Tableau I.2	Les normes de rejets des effluents liquides selon le JORAD	10
Tableau I.3	Comparaison de technologies physiques et chimiques, de dépollution des effluents textiles chargés de colorants synthétiques	14

CHAPITRE II

Tableau II.1	Les différentes natures de colorant et leurs souches pures d'élimination	25
Tableau II.2	les différentes natures de colorant et leurs souches mixtes d'élimination	26

CHAPITRE III

Tableau III.1	Les marques des techniques instrumentales utilisées.....	34
Tableau III.2	Les propriétés des produits utilisés	34
Tableau III.3	Les propriétés physico-chimiques des colorants étudiés	35

CHAPITRE IV

Tableau IV.1	Aspects microscopiques des souches isolées.....	41
Tableau IV.2	Résultats des tests biochimiques	44
Tableau IV.3	Résultats de l'identification par la galerie biochimique classique.....	45
Tableau IV.4	Classification des souches bactériennes par résultats de l'API 20 E	46

Table des matières

Avant-propos.....	
Dédicace.....	
Table de notations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	v
INTRODUCTION GENERALE.....	01
CHAPITRE I: GENERALITES SUR LES COLORANTS	
I.1. Historique des colorants	03
I.2. Classification des colorants	03
I.2.1. Les colorants azoïques	04
I.2.2. Les colorants anthraquinoniques	05
I.2.3. Les colorants indigoïdes	06
I.2.4. Les colorants xanthène.....	07
I.2.5. Les phtalocyanines.....	07
I.2.6. Les colorants nitrés et nitrosés.....	07
I.2.7. Les colorants triphénylméthanes.....	08
I.3. Les colorants et leurs impacts environnementaux.....	08
I.3.1. Bio-accumulation	08
I.3.2. Toxicité des colorants	09
I.4. Législation algérienne sur l'environnement :	10
I.5. Procèdes de traitement des eaux colorées:	11
I.5.1 Méthodes physiques	11
I.5.1.1. Filtration sur membrane	11
I.5.1.2. Adsorption (sur charbon actif)	11
I.5.2. Méthodes chimiques.....	11
I.5.3. Méthodes biologiques.....	12
I.5.3.1. Traitement aérobie.....	13
I.5.3.2. Traitement anaérobie.....	13
I.6. Résumé comparatif des procédés et analyse critique.....	13
CHAPITRE II: METHODE DE BIODEGRADATION BACTERIENNE	
II.1. Introduction.....	15
II.2. Les bactéries	15
II.3. Les entérobactéries	15
II.3.1. Taxonomie des entérobactéries.....	15
II.3.2. Métabolisme générale	16
II.3.3. Les entérobactéries saprophytes	16
II.3.4. Microflore des fruits et légumes.....	16
II.3.5. Microbiologie des produits végétaux et d'origine végétale.....	16

II.4. La croissance bactérienne.....	17
II.4.1. condition de croissance bactérienne.....	17
II.4.1.1. Besoins nutritif.....	17
II.4.1.2. Les facteurs environnementaux.....	18
II.4.2. Cinétique de la croissance bactérienne.....	19
II.4.3. Schéma de la croissance.....	20
II.4.3.1. Phase de latence	21
II.4.3.2. Phase d'accélération de croissance.....	21
II.4.3.3. Phase exponentielle de croissance.....	21
II.4.3.4. Phase de ralentissement.....	22
II.4.3.5. Phase stationnaire.....	22
II.4.3.6. Phase de mort accélérer.....	22
II.4.3.7. Phase de déclin (décroissance)	22
II.5. Evolution de la matière organique en présence d'une masse bactérienne.....	22
II.6. Les techniques classiques de la mesure de croissance.....	23
II.7. Décoloration par les bactéries.....	24
II.7.1. Utilisation des cultures bactériennes pures	24
II.7.2. Utilisation des cultures bactériennes mixte	25
II.8. Mécanisme de la biodégradation des colorants	26
II.9. Facteurs affectés à la biodégradation	27
II.9.1. Oxygène.....	27
II.9.2. Température	28
II.9.3. Potentiel d'hydrogène (pH)	28
II.9.4. concentration de colorant.....	29
II.9.5. Structure de colorant	30
II.9.6. L'électron donneur	31
II.9.7. potentiel d'oxydoréduction.....	32
II.9.8. L'intermédiaire d'oxydo -réduction	32

CHAPITRE III: MATERIELS ET METHODES

III.1. Introduction	34
III.2. Matériels et produits	34
III.2.1. Matériels utilisées.....	34
III.2.2. Propriétés des produits utilisés.....	34
III.3. Méthodes expérimentales.....	35
III.3.1. Préparation de l'échantillon.....	35
III.3.2. Préparation de la biomasse bactérienne	35
III.3.3. Méthode de dénombrement des souches	36
III.3.4. Isolement et purification des souches	36
III.3.5. Examen direct à l'état frais des souches	36
III.3.6. Sélection des souches	36
III.3.6.1. Coloration de gram.....	37

III.3.6.2. Tests biochimiques classiques.....	37
III.3.6.3. Spectrophotométrie.....	38
III.3.6.4. Chromatographies en phase liquide	39
III.3.6.5. Chromatographies Ionique.....	40
CHAPITRE IV: RESULTATS ET DISCUSSION	
IV.1. Etude microbiologique.....	41
IV.1.1. Etude microscopique	41
IV.1.2. Tests biochimiques.....	43
IV.2. Cinétique de la biodégradation des colorants par les souches bactériennes.....	46
IV.2.1. Cinétique de la biodégradation du méthyle orange par les souches bactériennes.....	46
IV.2.2. Cinétique de la biodégradation du rouge sirius par les souches bactériennes.....	48
IV.2.3. Cinétique de la biodégradation du colorant bleu par les souches bactériennes.....	51
IV.3. Effet de l'adaptation des bactéries aux colorants sur la cinétique de la biodégradation.....	53
IV.3.1. Cinétiques de biodégradation du MO par des bactéries non adaptées et adaptées	53
IV.3.2. Cinétiques de biodégradation du colorant rouge par des bactéries non adaptées et adaptées	55
IV.3.3. Cinétiques de biodégradation du colorant bleu par des bactéries non adaptées et adaptées.....	57
IV.4. Effet de l'Acidité initiale du milieu sur la cinétique de la biodégradation.....	58
IV.5 Analyse par chromatographie liquide à haute performance.....	60
IV.5.1. Chromatogramme (HPLC) du MO avant et après la biodégradation.....	60
IV.5.2. Chromatogramme (HPLC) du colorant Rouge Congo avant et après la biodégradation	61
IV.5.3. Chromatogramme (HPLC) du colorant Bleu Cibacete avant et après la biodégradation	62
IV.6. Analyse par Chromatographie Ionique.....	63
IV.6.1. Chromatogramme (CI) du colorant Bleu Cibacete avant et après la biodégradation.....	63
IV.6.2. Chromatogramme (CI) du colorant rouge avant et après la biodégradation.....	65
IV.6.3. Chromatogramme (CI) du MO avant et après la biodégradation.....	67
CONCLUSION GENERALE.....	69
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'augmentation de la population, l'intensification des activités industrielles et agricoles, le nombre grandissant d'agglomérations de plus en plus étendues et le mode de vie actuel exercent une pression très négative sur les ressources en eau.

Mieux produire et moins polluer sont les défis auxquels sont confrontés les industriels de tout secteur. Les contraintes sous forme législatives et normatives sont de plus en plus drastiques. Des industries aussi diverses que la chimie, la pétrochimie, agro-alimentaire, le textile, ou la papeterie et les tanneries produisent des effluents très divers qui nécessitent chaque fois des investigations nouvelles et la mise au point de procédés spécifiques.

La pollution des eaux provenant des rejets de l'industrie textile présente un vrai problème dont les aspects sont différents selon le niveau de développement des pays. Cette industrie génère de grandes quantités d'effluents fortement contaminés par les colorants. En effet, l'impact de ces eaux, trop colorées, de pH très variables, et à fortes demandes chimiques en oxygène (DCO) est sévèrement ressenti par la faune et la flore appartenant aux écosystèmes où sont évacués ces rejets.

Les colorants sont largement utilisés, dans les industries textiles pour leur stabilité chimique et la facilité de leur synthèse et leur variété de couleurs. Cependant, ces colorants sont à l'origine de la pollution une fois évacués dans l'environnement. La production mondiale des colorants est estimée à plus de 800 000 t•an⁻¹ et les colorants azoïques sont majoritaires et représentent 60-70 % [01].

La présence des colorants dans les eaux est l'un des problèmes environnementaux majeurs. Ils peuvent être éliminés car c'est des polluants visibles et à faible concentration.

Depuis toujours, le traitement des eaux usées s'est fait de manière biologique. Se basant sur l'autoépuration naturelle des eaux, l'homme a alors construit des systèmes de traitement biologique de plus en plus perfectionnés.

Dés études ont montré que plusieurs colorants azoïques sont toxiques et mutagènes et le traitement biologique de ces colorants semble présenter un intérêt scientifique majeur. Les traitements physico-chimiques communs (adsorption, coagulation/floculation, précipitation etc.) sont couramment utilisés pour les effluents industriels. Malgré leur rapidité, ces méthodes se sont avérées peu efficaces compte tenu des normes exigées sur ces rejets. Le traitement biologique constitue une alternative fiable; en effet, plusieurs microorganismes sont capables de transformer les colorants azoïques en sous-produits incolores [01].

L'objectif de ce travail est, en premier lieu, d'isoler, sélectionner, et identifier des bactéries issue de l'extrait betterave rouge pour dégrader des colorants azoïques. Les composés cibles choisis sont : méthyle orange, rouge congo et bleu cibacete.

Ce travail est réparti sur quatre chapitres. Dans les deux premier chapitre, nous présenterons une synthèse bibliographique qui rassemble des données essentielles sur les colorants synthétiques et la problématique de contamination des eaux usées riches par ces composés fortement colorés suivi d'une présentation des différentes techniques de dépollution adaptée aux effluents chargés de ces colorants, notamment les procédés de biodégradation bactérienne. Le troisième chapitre sera réservé pour détailler l'ensemble des méthodes expérimentales et du matériel utilisé dans ce travail. Le quatrième chapitre, sera consacré aux résultats obtenus suite à la biodégradation des colorants par les quatre souches isolées. L'effet de différents paramètres expérimentaux sur la cinétique de biodégradation, cette partie sera clôturée par les résultats de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et Chromatographie ionique.

Finalement, les principaux résultats obtenus dans ce travail seront synthétisés dans une conclusion générale.

Chapitre I

GENERALITES SUR LES COLORANTS

I.1. Historique des colorants

Depuis le début de l'humanité, les colorants ont été appliqués dans pratiquement toutes les sphères de notre vie quotidienne pour la peinture et la teinture du papier, de la peau et des vêtements, etc. Jusqu'à la moitié du 19^{ème} siècle, les colorants appliqués étaient d'origine naturelle. Des pigments inorganiques tels que l'oxyde de manganèse, l'hématite et l'encre étaient utilisés. Par ailleurs, des colorants naturels organiques ont été appliqués, surtout dans l'industrie textile. Ces colorants sont tous des composés aromatiques qui proviennent essentiellement des plantes, telles que l'alizarine et l'indigo.

L'industrie des colorants synthétiques est née en 1856 quand le chimiste anglais William Henry Perkin, dans une tentative de synthèse de la quinine artificielle pour soigner la malaria, a obtenu la première matière colorante synthétique qu'il appela « mauve » (aniline, colorant basique). Perkin a breveté son invention et il a installé une chaîne de production, qui serait bientôt suivie par d'autres. De nouveaux colorants synthétiques commencent à paraître sur le marché. Ce processus a été stimulé par la découverte de la structure moléculaire du benzène en 1865 par Kekulé. En conséquence, au début du 20^{ème} siècle, les colorants synthétiques ont presque complètement supplantés les colorants naturels [02].

I.2. Classification des colorants

Contrairement à l'usage établi en chimie organique, la terminologie employée dans le domaine des colorants n'obéit à aucune règle absolue. Une classification rationnelle des matières colorantes organiques présente de grandes difficultés. Certains auteurs regroupent ces colorants d'après leur constitution chimique, en tenant compte de la nature des chromophores qui les composent: groupement azoïque, anthraquinone, triarylméthane et phtalocyanine [03]; d'autres les regroupent d'après les diversités des technologies d'application: colorants anioniques (acides, à mordant-acide, directs, réactifs, de cuve, colorants au soufre) ou cationiques (basiques) [04].

Les noms commerciaux rappellent les nuances, leur emploi principal ou le nom de leur inventeur. Les chiffres et les lettres qui suivent parfois le nom précisent la nuance ou certaines propriétés comme la résistance à la lumière ou à divers agents (**figure I.1**).

Le classement des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du groupe chromophore (**tableau I.1**) [05].

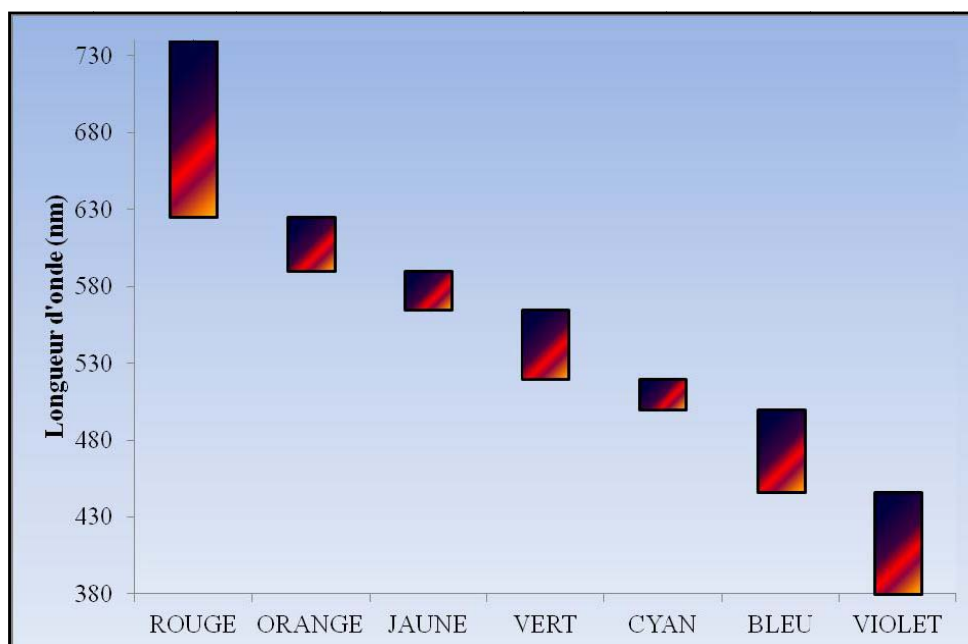


Figure I.1: Domaines d'absorption des quelques couleurs [04].

Tableau I.1: Classement des colorants selon leur structure chimiques.

Groupes chromophores	Groupes auxochromes
Azo : -N=N-	Amino: -NH ₂
Nitro : -NO ₂ ou =ON-OH	Méthylamino: -NHCH ₃
Carbonyl : =C=O	Diméthylamino: -N(CH ₃) ₂
Vinyl : -C=C-	Hydroxyl: -HO
Nitro (-NO ₂ ou =NO-OH)	Alkoxy: -OR
Sulfure (>C=S)	Groupes donneurs d'électron

I.2.1. Les colorants azoïques

Les colorants "azoïques" sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo (-N=N-) unissant deux groupements alkyles ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique). Ces structures qui reposent généralement sur le squelette de l'azobenzène, sont des systèmes aromatiques ou pseudo aromatiques liés par un groupe chromophore azo (figure I.2).

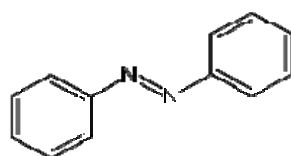


Figure I.2: Structure chimique des colorants azoïques

a) Propriétés physico-chimiques

On nomme "azoïque" les composés caractérisés par le groupe fonctionnel azo ($-N=N-$) unissant deux groupements alkyle ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique). Ces structures qui reposent généralement sur le squelette de l'azobenzène sont des systèmes aromatiques ou pseudo-aromatiques liés par un groupe chromophore azo ($N=N-$).

L'introduction de groupes azo entre deux noyaux aromatiques déplace le spectre d'absorption du benzène vers les grandes longueurs d'onde de telle sorte que la couleur apparaît (effet bathochrome). Le plus simple des azoïques, l'azobenzène, est jaune-orangé. L'introduction de groupes amine ou phénol a également un effet bathochrome, de même que la multiplication des groupes azoïques (exemple de colorant diazoïque **figure I.3**), aussi peut-on obtenir presque toutes les nuances du spectre. La présence dans un tel édifice de substituants sulfonés, nitrés ou halogénés, donneurs d'électrons sur l'un des cycles aromatiques et accepteurs sur les seconds cycles, permet d'augmenter le phénomène de résonance. C'est ainsi que l'on peut jouer sur la couleur et sur les qualités de teinture. En général, plus le système π de la molécule est conjugué, plus la longueur d'onde qu'il absorbera sera grande. Cependant la complexité des molécules diminue la vivacité des nuances. Exemple : Colorant diazoïque dissymétrique.

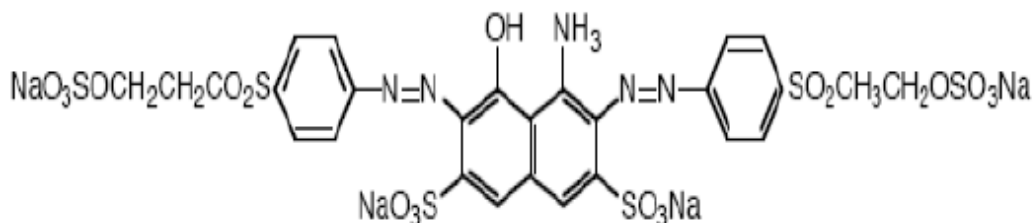


Figure I.3: Structure chimique du colorant diazoïque dissymétrique

Les substituant fixés sur les noyaux aromatiques ont une influence directe sur l'attaque par les radicaux hydroxyles. Les groupes acétamide $-NCOCH_3$ et hydroxyle $-OH$ (effets inductifs $-I$ et mésomère $+M$) interagissent sur le noyau aromatique en délocalisant les électrons p du noyau et les électrons non appariés des hétéroatomes. En conséquence, le noyau phényle est enrichi en électrons ce qui favorise les attaques électrophiles.

b) Toxicité

La toxicité des différents types de colorants (mortalité, effet mutagénique et cancérigène) a été étudiée par plusieurs travaux de recherche aussi bien sur des organismes

aquatiques (poisson, algue, bactéries, etc.) que sur les mammifères. En outre, des recherches ont été effectuées pour étudier l'effet des colorants sur l'activité des bactéries aérobies et anaérobies dans des systèmes de traitement des eaux résiduaires.

La toxicité des azoïques par exposition aux colorants et à leurs métabolites n'est pas un fait nouveau. Dès 1895, l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques [06]. Depuis, les travaux effectués sur ces colorants ont démontré que ces composés chimiques présentaient des effets cancérogènes pour l'homme et l'animal. La plupart des colorants azoïques ne sont pas initialement toxiques, exceptés ceux à groupement amine libre [07]. Cependant, la réduction de ces colorants (rupture de la liaison azoïque) génère la formation des amines aromatiques qui sont connues mutagènes et cancérogènes. A titre d'exemple, on peut citer : 1,4-phenylenediamine, 1-amino 2-naphtol et benzidine [08].

I.2.2. Les colorants anthraquinoniques

D'un point de vue commercial, ces colorants sont les plus importants après les colorants azoïques. Leur formule générale dérivée de l'anthracène montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amines (figure I.4).

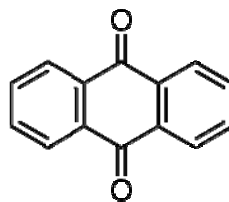


Figure I.4: Structure chimique des colorants anthraquinoniques

I.2.3. Les colorants indigoïdes

Ils tirent leur appellation de l'Indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues sélénié, soufré et oxygéné du Bleu Indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquoise (figure I.5).

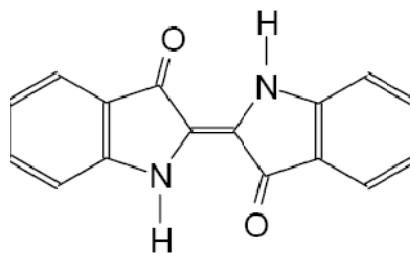


Figure I.5: Structure chimique des colorants indigoïdes

I.2.4. Les colorants xanthène

Ces colorants sont dotés d'une intense fluorescence. Le composé le plus connu est la fluorescéine. Peu utilisé en tant que teinture, leur faculté de marqueurs lors d'accident maritime ou de traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines est malgré tout bien établie (**figure I.6**).

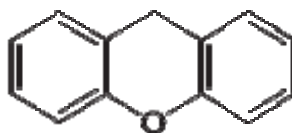


Figure I.6: Structure chimique des colorants xanthènes

I.2.5. Les phtalocyanines

Ils ont une structure complexe basée sur l'atome central de cuivre. Les colorants de ce groupe sont obtenus par réaction du dicyanobenzène en présence d'un halogénure métallique (Cu, Ni, Co, Pt, etc.) (**figure I.7**).

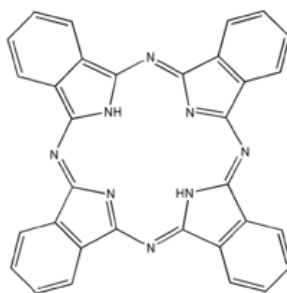


Figure I.7: Structure chimique des phtalocyanines

I.2.6. Les colorants nitrés et nitrosés

Ces colorants forment une classe très limitée en nombre et relativement ancienne. Ils sont actuellement encore utilisés, du fait de leur prix très modéré lié à la simplicité de leur structure moléculaire caractérisée par la présence d'un groupe nitro ($-\text{NO}_2$) en position ortho d'un groupement électro donneur (hydroxyle ou groupes aminés) (**figure I.8**).

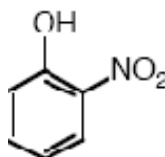


Figure I.8: Structure chimique des colorants nitrés et nitrosés

I.2.7. Les colorants triphénylméthanés

Les triphénylméthanés sont des dérivés du méthane pour lesquels les atomes d'hydrogène sont remplacés par des groupes phényles substitués dont au moins un est porteur d'un atome d'oxygène ou d'azote en para vis-à-vis du carbone méthanique. Le triphénylméthane et ses homologues constituent les hydrocarbures fondamentaux d'où dérivent toute une série de matières colorantes (**figure I.9**).

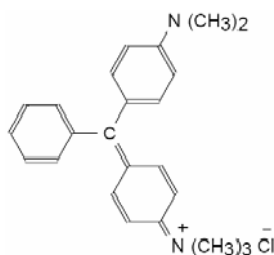


Figure I.9: Structure chimique des colorants triphénylméthanés

I.3. Les colorants et leurs impacts environnementaux

Beaucoup de colorants sont visibles dans l'eau même à de très faibles concentrations ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$). Ainsi, ils contribuent aux problèmes de pollution liés à la génération d'une quantité considérable d'eau usée contenant des colorants résiduels [09]. Le rejet de ces eaux résiduaires dans l'écosystème est une source dramatique de pollution, d'eutrophisation et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique et par conséquent présente un danger potentiel de bioaccumulation qui peut affecter l'homme par transport à travers la chaîne alimentaire.

I.3.1. Bio-accumulation

Si un organisme ne dispose pas de mécanismes spécifiques, soit pour empêcher la résorption d'une substance, soit pour l'éliminer une fois qu'elle est absorbée, alors cette substance s'accumule. Les espèces qui se trouvent à l'extrémité supérieure de la chaîne alimentaire, y compris l'homme, se retrouvent exposées à des teneurs en substances toxiques pouvant aller jusqu'à cent mille fois plus élevées que les concentrations initiales dans l'eau, l'illustration du phénomène de bioaccumulation d'insecticides présenté sur la **figure I.2**.

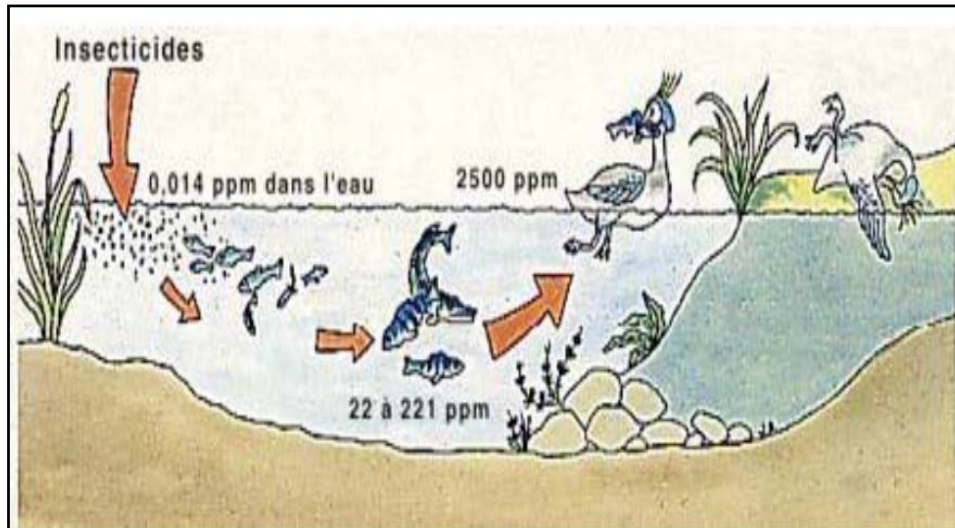


Figure I.10: Conséquences de la bioaccumulation après déversement de substances toxiques (insecticides) dans un cours d'eau [10].

I.3.2. Toxicité des colorants

Par définition, la toxicité est la mesure de la capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes sur toute forme de vie, telle qu'un être humain, une bactérie ou une plante ou une sous structure de cet organisme tel que le foie. Le sujet d'une étude toxicologique se fait sur une substance ou sur les conditions externes et leurs effets délétères sur les organismes

vivants, tissus, cellules ou organites. Selon la dose on distingue trois formes de toxicité: la toxicité aiguë, la toxicité sub-aiguë et la toxicité à long terme.

L'indicateur quantitatif le plus utilisé de la toxicité est la dose létale 50 (DL_{50}). Il s'agit de la masse de substance nécessaire pour tuer 50% d'organismes dans un lot. Elle s'exprime en milligrammes de matière active par kilogramme de biomasse.

Une étude effectuée sur le recoupement des DL_{50} avec les classifications chimiques et tinctoriales des colorants, démontre que les colorants synthétiques organiques les plus toxiques sont les colorants diazo et cationiques [09].

Des études faites sur divers colorants commerciaux ont démontré que les colorants basiques sont les plus toxiques pour les algues [11]. Ce résultat a été prouvé par le test de mortalité des poissons effectués sur 3000 colorants commerciaux où il s'est avéré que les colorants basiques, et particulièrement ceux de la famille de triphénylméthane sont les plus toxiques. Par ailleurs, les poissons semblent être relativement sensibles aux colorants acides [12]. D'autre part, la mortalité examinée avec des rats a montré que seulement 1% sur 4461 colorants commerciaux présentent des valeurs de DL_{50} au dessous du poids corporel de 250 mg kg⁻¹. Par conséquent, la chance de la mortalité humaine due à la toxicité aiguë de colorant

est probablement très basse. Cependant, il faut sensibiliser l'être humain quant à l'utilisation de certains colorants. En effet, il a été prouvé que quelques colorants dispersés peuvent causer des réactions allergiques, dermatologiques, etc. [13].

En revanche, la toxicité des amines aromatiques est fortement liée à la structure spatiale de la molécule ou, en d'autres termes, à la position des groupes aminés. Par exemple, le 2-naphtylamine est cancérigène, par contre, le 1-naphtylamine est beaucoup moins toxique que le premier [14]. La toxicité des colorants azoïques dépend ainsi de la nature et de la position des substituants. Elle est accrue par la présence de substituants sur le noyau aromatique notamment des groupes nitro ($-\text{NO}_2$) et halogènes (particulièrement Cl) Cependant, la substitution avec des groupes carboxyliques ou sulfonates diminue la toxicité [15].

Des travaux de recherche faisant l'objet d'étude de l'effet mutagène et cancérigène des amines aromatiques sulfonées, ont montré qu'ils ne présentent aucun ou un très faible effet génotoxique et cancérigène, contrairement à leurs analogues non sulfonés [16]. En raison des effets mentionnés ci-dessus, il est clair que les colorants, essentiellement les azoïques, ne devraient pas envahir notre environnement. Par conséquent, il est nécessaire de traiter les eaux résiduelles chargées de ces colorants jusqu'à leur minéralisation totale.

I.4. Législation algérienne sur l'environnement :

Les normes de rejets des effluents industriels résultent de la loi n° 83-17 du 16 Juillet 1983 portant code des eaux, de l'ordonnance n° 96-13 du 15 Juin 1996 modifiant et complétant la loi n° 83-17, du décret exécutif n° 93-160 du 10 Juillet 1993 réglementant les rejets d'effluents liquides des industriels et du décret exécutif n° 06-141 du 19 avril 2006 de la république algérienne démocratique définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels (**tableau I.2**).

Tableau I.2 : les normes de rejets des effluents liquides selon le JORAD [17].

Paramètres	Valeurs limites	Paramètres	Valeurs limites
Température (°C)	30	Fluor et composés	15
pH	6.5-8.5	Hydrocarbures (mg/l)	10
DBO5 (mg/l)	30	Pb (mg/l)	0.5
DCO (mg/l)	120	Fe (mg/l)	3
MES (mg/l)	35	Hg (mg/l)	0.01
Azote total (mg/l)	30	Cu (mg/l)	0.5
Phosphor total (mg/l)	10	Zn (mg/l)	3

I.5. Procèdes de traitement des eaux colorées:

I.5.1 Méthodes physiques

I.5.1.1. Filtration sur membrane

Cette technique permet la séparation de particules, de molécules ou d'ions entre deux phases. La membrane est constituée d'une couche mince (de dix à quelques centaines de microns) d'une matière permettant l'arrêt ou le passage sélectif de substances sous l'action d'une force motrice de transfert. Cette force peut provenir de la convection ou de la diffusion des molécules induites par un gradient de champ électrique, de concentration, de pression ou encore de température. La nature de la membrane varie et son application à la dépollution de l'eau en dépend fortement : il existe des membranes poreuses (microfiltration: pores de 0,05 à 10 μm , ultrafiltration: pores de 1 à 100 nm, nanofiltration: pores de 1 à 2 nm), des membranes denses (osmose inverse) ou encore des membranes échangeuses d'ions. Le procédé d'osmose inverse est utilisé pour le dessalement de l'eau de mer et la production d'eau ultra-pure [18]. Les autres procédés membranaires sont souvent couplés à d'autres techniques (biologiques, chimiques) de dépollution et sont utilisés en tant que pré ou post traitement [19].

I.5.1.2. Adsorption (sur charbon actif)

Le charbon actif est le plus couramment utilisé en adsorption des molécules colorantes, toutefois un grand nombre d'autres matériaux peuvent être employés. Plusieurs charbons de différentes origines ont montré une grande efficacité d'adsorption des colorants. La surface spécifique des charbons actifs du commerce, employés pour l'épuration des eaux résiduaires, se situe entre 600 et 1200 m^2g^{-1} . La plupart des molécules organiques se fixent à leur surface (capable d'adsorber la plupart des colorants) [20]. Les plus mal retenues sont les plus polaires non aromatiques et les linéaires de très faible masse molaire (alcools simples, premiers acides organiques, etc.). La principale limite d'un tel traitement réside dans le fait qu'en aucun cas les polluants ne sont dégradés mais concentrés sur le charbon actif qui doit être traité ultérieurement afin de le régénérer. De plus, le coût du charbon actif est relativement élevé [21].

I.5.2. Méthodes chimiques

Les techniques d'oxydation chimique sont généralement appliquées quand les procédés biologiques sont inefficaces. Elles peuvent être ainsi utilisées en étape de prétraitement pour les procédés biologiques. L'oxydation chimique est souvent appliquée pour le traitement des eaux usées contenant des polluants non biodégradables et /ou toxiques et de fortes concentrations que les autres procédés ne peuvent pas traiter ou transformer en produits

biodégradables et/ou non toxiques. Ainsi, l'oxydation chimique se révèle un procédé efficace de traitement des eaux usées. On distingue:

- les procédés classiques d'oxydation chimique
- les procédés d'oxydation avancée

Les procédés classiques d'oxydation chimique sont basés sur l'ajout d'un agent oxydant dans la solution à traiter. Les principaux agents oxydants sont:

- Cl_2 : représente un oxydant moyennement fort et est utilisé pour le traitement des eaux usées ou plutôt pour la désinfection comme l'ozone. En revanche, ils présentent l'inconvénient de produire des sous produits halogénés cancérigènes pour l'homme;
- O_2 : il est considéré comme un oxydant modéré, le coût tolérable de ce procédé le rend fréquemment choisi;
- H_2O_2 : il est considéré parmi les oxydants les plus appropriés et les plus recommandés pour une grande variété de procédé, utilisé avec ou sans catalyseur. Toutefois, l'utilisation de cet oxydant seul n'est pas efficace pour la plupart des produits organiques;
- O_3 : c'est un oxydant très fort qui a presque le même avantage que l'oxygène ou le peroxyde d'hydrogène. Le problème majeur lié à l'utilisation de cet oxydant est son instabilité, d'où la nécessité de production sur le site.

Il a été observé que l'oxydation chimique avec l'un de ces oxydants n'est pas toujours efficace pour le traitement des polluants organiques persistants.

Les POA ont l'avantage de pouvoir fonctionner à température ambiante et en condition de pression normale. De plus, les potentialités offertes par ceux-ci peuvent être combinées avec un traitement biologique en procédant, en aval ou en amont de ce dernier, à une dégradation oxydante des substances toxiques réfractaires.. Dès lors, quand les produits intermédiaires d'oxydation peuvent être facilement biodégradés, il est alors recommandé de coupler ces procédés avec des procédés biologiques, afin de réduire les coûts de traitement.

1.5.3. Méthodes biologiques

Par épuration biologique des eaux, on entend la décomposition des polluants organiques dans l'eau par les microorganismes. Les procédés biologiques se partagent en deux catégories : les traitements aérobies en présence d'oxygène et anaérobies sans oxygène.

I.5.3.1. Traitement aérobie

Les polluants sont décomposés dans une unité biologique constituée d'un bassin de boue activée par des bactéries aérobies et autres microorganismes en une boue qui sédimente.

Dans le cas idéal, les polluants organiques sont oxydés jusqu'au dioxyde de carbone. Après épuration la boue est séparée des eaux usées par sédimentation dans un décanteur ; une partie est recyclée et le surplus est évacué après pressage ou centrifugation.

I.5.3.2. Traitement anaérobie

À l'inverse de la biodégradation aérobie, la digestion anaérobie des composés organiques s'effectue en l'absence d'oxygène et forme du dioxyde de carbone, du méthane et de l'eau. C'est un procédé efficace pour le traitement de déchets très chargés en matières organiques et le méthane formé peut être utilisé comme énergie de chauffage. Les conditions de réduction dans la digestion anaérobie sont adaptées à la décoloration des colorants azoïques par clivage de la liaison azo entraînant une destruction subséquente du groupe chromophore, mais une minéralisation complète est impossible dans ce type de procédé. La dégradation des molécules initiales entraîne souvent la formation d'amines plus toxiques que la molécule initiale, qui finissent dans les sédiments aquifères peu profonds et les eaux souterraines. Les méthodes de bio-traitement conventionnelles sont sans effet sur la plupart des colorants synthétiques à cause de leur structure polyaromatique complexe et leur nature réfractaire. Venceslau [22] ont estimé à seulement 10-20 % la réduction de la coloration par les procédés biologiques.

I.6. Résumé comparatif des procédés et analyse critique

Bien que les méthodes physiques, chimiques et physicochimiques soient très rapides, elles se sont avérées très coûteuses et peu efficaces compte tenu des normes exigées. En effet, plusieurs études ont montré que ces méthodes sont, d'une part, efficaces contre certaines des molécules colorantes et pas sur d'autres et, d'autre part, qu'elles chargent le milieu naturel avec des polluants organiques parfois plus toxiques que les molécules d'origines [23]. Il est à noter aussi que ces méthodes sont très coûteuses et nécessitent un équipement bien sophistiqué [24]. Ce constat a permis aux chercheurs et aux industriels de s'orienter vers la recherche d'autres méthodes qui soient plus efficaces et moins coûteuses: ce sont les procédés biologiques. Après ce bref aperçu des principes de fonctionnement des procédés physiques et chimiques de dépollution des rejets de colorants, le **tableau I.3** résume les types d'application et leurs principaux avantages et inconvénients.

Tableau I.3: Comparaison de technologies physiques et chimiques, de dépollution des effluents textiles chargés de colorants synthétiques [25].

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

Chapitre II

METHODE DE BIODEGRADATION BACTERIENNE

II.1. Introduction

À l'heure actuelle, l'objectif du traitement biologique des eaux usées est, à la fois d'obtenir des temps minimaux de résidence de l'eau dans les installations, et d'atteindre les meilleurs taux d'élimination des polluants par l'action des microorganismes. Ainsi l'intensification du procédé d'épuration obtenue grâce à l'augmentation de la quantité de biomasse permet une élimination élevée du substrat [26].

Le mot biodégradation (ou dégradation biologique) désigne un phénomène naturel, général dans le monde, tendant à transformer et minéraliser les déchets organiques, grâce à l'action des microorganismes, notamment des bactéries [27]. L'homme peut aussi accélérer artificiellement ce processus en favorisant le développement des bactéries, dans des stations d'épuration d'eau usées et d'effluents gazeux.

II.2. Les bactéries :

Ce sont des microorganismes unicellulaires, comme elles n'ont pas de noyau délimité par une membrane, les cellules sont dites procaryotes. Les trois principales formes de bactéries sont les bacilles, les cocci et les formes spiralées.

La plupart des bactéries ont une paroi cellulaire de peptidoglycane: elles se reproduisent de façon asexuée par scissiparité. Certaines bactéries possèdent les flagelles qui les rendent mobiles. Les substances chimiques de toutes sortes peuvent servir de nourriture pour les bactéries [28].

II.3. Les entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles ou coccobacilles à sporulées gram (-), oxydase (-) aéro-anaérobie, nitrate réductase (+) et fermentation du glucose (+). Les caractères d'appartenance à la famille des enterobactériaceae peuvent être mis en évidence par culture sur les milieux suivants: gélose VF semi-solide profonde, milieu Hugh et leifson glucosé ou mévag glucosé, gélose nitrate, les entérobactéries se multiplient facilement sur un milieu ordinaire à pH neutre, à une température de 37°C. Elle donne des colonies pigmentées (sauf serratia) lisse ou rugueuse de 1 à 3 mm de diamètre, certaines espèces sont mobiles d'autres pas [29].

II.3.1. Taxonomie des entérobactéries:

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma Entérobactériaceae et

dans lequel il rassembla les genres bactériens déjà décrits (tel que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Shigella*) dans le genre unique *Enterobacter*.

- La subdivision des genres et espèces est basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques biochimiques, antigénique et génétiques des bactéries (139 espèces regroupées dans 31 genres en 1997).
- La classification des entérobactéries au niveau de la famille est en fait toujours en évolution bien que des modifications, dont certaines pourraient être importées sont possible dans un avenir proche [30].

II.3.2. Métabolisme générale

Les entérobactéries sont chimiotrophe, c'est-à-dire qu'elles produisent leur énergie lors de réactions chimiques d'oxydoréduction et ne possèdent pas de pigment chlorophyllien. Ce métabolisme nécessite un substrat organique (généralement un sucre) ; elles sont donc chimio-organotrophe. beaucoup sont des phototrophe à partir d'une source unique de carbone (sucre) et d'énergie (électrons), elles sont capable de synthétiser tous les éléments nécessaire à leur survie et à leur croissance d'autres, moins nombreuse, sont auxotrophes : elle ne peuvent se multiplier sans la présence dans leur milieu de culture d'un ou plusieurs facteurs de croissance (vitamine, acide aminés) [31].

II.3.3. Les entérobactéries saprophytes

Les entérobactéries saprophytes sont présentes dans les sols, les eaux, les végétaux et dans tout types d'environnement humide en général, elles participent à la dégradation des matières organiques. On compte parmi celle-ci les *Proteus*, les *Providencia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, qui sont plus adaptés à l'environnement.

II.3.4. Microflore des fruits et légumes

Bactérie: en raison du pH trop bas de la plus part des fruits, les bactéries altèrent essentiellement les légumes. Elles sont incapables de pénétrer la surface continue des tissus végétaux mais peuvent le faire par les orifices naturels (les hydrates, les stomates, et lenticelles)

II.3.5. Microbiologie des produits végétaux et d'origine végétale

Fruits et légumes: la forte teneur en eau, la présence d'hydrate de carbone sont d'autant plus métabolisable qu'ils sont moins condensés. L'hydrolyse des substances des réserves polysaccharidiques va toujours favoriser le développement microbien [29].

II.4. La croissance bactérienne

La croissance bactérienne est un processus complexe qui se déroule en plusieurs séquences: absorption de nutriments de base requis présents dans le milieu, conversion de ces nutriments en matériel cellulaire et en énergie, réplication du génome et augmentation de la taille avec duplication de l'ensemble des éléments constituant le matériel cellulaire, division en deux cellules fille dotée chacune d'une copie du génome et des autres composants cellulaires. La présence des nutriments est une condition nécessaire mais non suffisante pour la croissance bactérienne qui n'est possible que dans des conditions physico-chimiques et en présence de certains facteurs environnementaux.

II.4.1. condition de croissance bactérienne

II.4.1.1. Besoins nutritif

Les besoins nutritifs requis par les cellules peuvent être classés en deux catégories: les macroéléments et les micro éléments.

a). macroéléments

- Les besoins des microorganismes en macroéléments sont de concentrations supérieures à 10^{-4} M.
- Le carbone C est le constituant majeur de la cellule bactérienne, représentant approximativement 50% du poids sec. Les hétérotrophes ont besoin du carbone sous forme de composés organiques réduits, relativement complexe comme le glucose.
- L'azote N constitue 10 à 14% du poids sec. Les sources d'azote les plus communément utilisées sont l'ammoniac, les sels d'ammonium (NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3), les protéines, les peptides et les aminoacides.
- Le phosphore P constitue 3% du poids sec. Les sels inorganiques de phosphate tels que KH_2PO_4 et K_2HPO_4 , sont les plus utilisés comme source d'azote.
- Le soufre S constitue approximativement 1% du poids sec. Les sels de sulfate tels que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sont les principales sources de soufre.
- Le potassium K est le cofacteur de quelques enzymes et participe dans le métabolisme des hydrocarbures. Les cellules tendent activement à utiliser K^+ et Mg^{2+} et à exclure Na^+ et Ca^{2+} . Les sels de potassium les communément utilisés sont K_2HPO_4 , KH_2PO_4 et K_3PO_4 .
- Le magnésium est habituellement fourni sous forme de MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ ou MgCl_2 .

b). Les microéléments

Les éléments traces sont essentiels à la nutrition bactérienne. Les plus utilisés sont le fer Fe, le zinc Zn et le manganèse (Mn). Certains ions tels que Mg^{2+} , Fe^{3+} et PO_4^{3-} peuvent précipiter dans le milieu nutritif et devenir inutilisables par les cellules. Des agents chimiques permettent la formation des composés solubles avec les ions précipités. L'acide citrique, l'EDTA, les polyphosphates, l'histidine, la tyrosine et la cystéine sont les agents les plus utilisés [32]. La croissance dépendra parfois de la présence dans le milieu de composés organiques dont la synthèse est impossible: il y a *auxotrophie* et les molécules incriminées telles que les vitamines, les acides aminés, les acides gras et les nucléotides sont appelées facteur de croissance [33].

II.4.1.2. Les facteurs environnementaux

Outre les exigences nutritives, le développement bactérien est sous la dépendance de conditions physico-chimiques dont les plus importants sont:

a) Température

La température exerce une influence déterminante sur l'ensemble de l'activité cellulaire bactérienne et joue un rôle essentiel dans la croissance. Propriété commune à toutes les réactions chimiques et enzymatique la croissance est accélérée par une augmentation de la température et on peut considérer globalement que la vitesse de croissance double lorsque la température s'élève de 10°C. Toute fois, à partir d'une certaine température, certains constituants (enzymes, acides nucléiques) ou structures cellulaires peuvent subir une altération ou dénaturation. Donc la destruction thermique emportera sur la croissance cellulaire. Selon la zone de température optimale de développement on distingue trois catégories principales de microorganismes [33].

- Les psychrophiles de 10 à 20°C.
- Les Mésophiles de 25 à 35°C.
- Les thermophiles de 50 à 60°C.

b) Oxygène dissous

Les microorganismes peuvent croître en présence et ou absence de l'oxygène et comme l'oxygène est toujours présent sous forme liée à divers composés du milieu ou au sein de bactéries: eau, hydroxyles, carbonyles, carboxyles donc sa présence peut être indispensable ou au contraire toxique, car revenant à sa fonction réductrice ; l'oxygène permet la formation de produits toxiques tels que le superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène

(H₂O₂) ou les radicaux hydroxyles. Cependant les cellules produisent des enzymes (catalase, peroxydase, superoxyde dismutase) pour les désactiver.

Selon leurs besoins de l'oxygène on peut distinguer trois classes de microorganismes: les aérobies stricts, les anaérobies facultatifs et les anaérobies stricts.

Les microorganismes aérobies utilisent l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons dans la respiration. Les anaérobies en contre partie, utilisent d'autres accepteurs d'électrons tels que les sulfates, les nitrates ou le CO₂.

c) Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH mesure l'activité de l'ion [H₃O⁺]. Il est particulièrement important comme paramètre de la croissance bactérienne ainsi que l'ionisation des composés chimiques. Il joue aussi un rôle dans le transport des nutriments et des substances toxiques dans la cellule [34].

Les limites de pH pour la croissance et la reproduction bactérienne ont été étudiées par de nombreux auteurs en particulier, Baas-Becking [35]. Les pH alcalins sont d'une façon générale préjudiciable aux microorganismes avec une limite de leur développement se situant pour des valeurs de l'ordre de 9 à 9,5. Pour les valeurs comprises entre 0 et 8, on observe différents types de comportement liés à leur aptitude à tolérer et (ou) métaboliser les acides organiques (minéraux) présent dans le milieu. Ainsi les bactéries sont, en règle générale, *neutrophiles* et présentent une meilleure croissance pour les pH voisin de 7. Lorsque le pH tombe à 5, elles sont inhibées. Certaines d'entre elles a métabolisme acidogène sont cependant capable de se reproduire pour des valeurs inférieures [33].

d) Toxicité

De nombreuses substances ont un effet toxique sur l'activité des microorganismes. Il peut y avoir inhibition partielle ou totale de l'épuration selon la nature de la substance incriminée ou sa concentration. On appelle concentration bactéricide celle qui tue la bactérie, et concentration bactériostatique celle qui immobilise temporairement le développement bactérien. La plupart des métaux sont toxiques tans pour les systèmes biologiques, aérobies qu'anaérobie, même chose pour de nombreux composés organiques.

II.4.2. Cinétique de la croissance bactérienne

L'étude de la croissance bactérienne en présence d'un mélange de substrats est un des domaines les plus riches de la biologie expérimentale. Ce phénomène présente aussi un grand intérêt écologique et technologique. Dans la nature ou dans plusieurs environnements engendrés par les activités humaines tels que les systèmes de traitement des eaux usées et les

fermenteurs commerciaux, les microorganismes se développent en présence de divers mélanges de substrat [36].

Pour pouvoir suivre la cinétique de croissance il fallu à l'origine de modéliser cette croissance dans un milieu non renouvelé, ce qui correspond à l'analyse «*descultures en batch*» [37]. Ce mode de croissance est obtenu en culture sur milieu liquide, réalisée en flacon (tube à essais, erlens,...) ou en bioréacteur pour mener des cultures en conditions contrôlées. Le milieu n'est pas renouvelé et sa capacité d'utilisation se limite à ses ressources initiales.

Toutes les bactéries cultivées se développent d'une même cinétique de croissance, exprimée par une courbe de croissance caractéristique qui rend compte de l'évolution de la concentration cellulaire, exprimée en nombre de cellules ou en masse bactérienne par unité de volume du milieu de culture, en fonction du temps.

II.4.3. Schéma de la croissance

Comme on a dit précédemment, la culture en batch permet de suivre tout le cycle d'une population bactérienne. Ce cycle est également représenté sous forme d'une courbe de croissance correspondant au suivi de la population (densité de population) ou au suivi de la biomasse (densité de la biomasse X), éventuellement après transformation logarithmique, en fonction du temps.

D'après Buchanan, la cinétique de croissance d'une population bactérienne est décomposée en sept phases (**figure II.1**) [38].

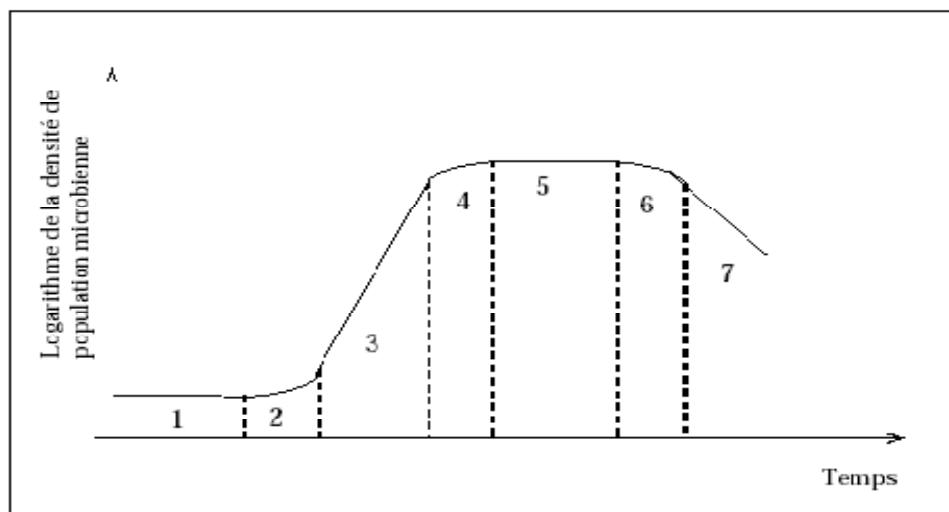


Figure II.1: les phases de croissance établies par Buchanan (1918) [39].

II.4.3.1. Phase de latence

Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise en particulier les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser le substrat présent [Reatz et Bauer, 2001]. Au cours de cette phase, il n'y a pas de reproduction cellulaire :

$$X = Cte = X_0$$

- X: la concentration cellulaire (nombre de cellule ou concentration en biomasse bactérienne par unité de volume de culture).
- X_0 : la concentration cellulaire au temps $t = 0$.
- Vitesse de croissance ($dX/dt = X \mu$) exprimée en $g.l^{-1}.h^{-1}$ (ou en nombre de cellules par unité de volume et unité de temps) est nulle.
- μ : le taux de croissance.

II.4.3.2. Phase d'accélération de croissance

Lorsque la phase d'adaptation précédente est terminée, on assiste au démarrage de la croissance proprement dite : la reproduction cellulaire commence.

II.4.3.3. Phase exponentielle de croissance

Pendant cette phase, les microorganismes se divisent et doublent leur nombre à intervalle de temps régulier d'où la population est presque uniforme en termes de propriétés chimiques et physiologiques. Au cours de cette phase, la vitesse de croissance dX/dt augmente, et ce proportionnellement à X. D'où l'allure logarithmique (ou exponentielle) du phénomène. En coordonnées semi-logarithmique, ($\log X = f(t)$), cette phase a l'allure d'une droite.

$$dX/dt = \mu X$$

On peut modéliser simplement la phase exponentielle de croissance par :

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t}$$

$$\log X = \log X_0 + \mu t$$

Le taux de croissance est quant à lui constant et maximal, il est défini par l'équation différentielle suivante :

$$\mu = dX/dt \cdot 1/X = \mu_{\max}$$

$$\text{Pour cette phase : } \log X_2 - \log X_1 = \mu_{\max} (t_2 - t_1)$$

$$\mu_{\max} = (\log X_2 - \log X_1) / (t_2 - t_1)$$

II.4.3.4. Phase de ralentissement

La vitesse de taux de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture du fait de la disparition de un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance et à une accumulation des produits inhibiteurs résultants du métabolisme bactérien. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

II.4.3.5. Phase stationnaire

Dans cette période, il n'y a aucune augmentation du nombre de bactéries. Le taux de croissance par organisme est nul.

II.4.3.6. Phase de mort accélérée

Durant cette période, le nombre de bactéries décroît, d'abord lentement puis de plus en plus vite, jusqu'à l'établissement d'une phase de mortalité logarithmique. Le taux de mortalité par organisme augmente jusqu'à un certain maximum.

II.4.3.7. Phase de déclin (décroissance)

Un changement nuisible de l'environnement comme la carence en nutriment et l'accumulation de déchets toxiques conduisent à la diminution du nombre de cellules viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes, caractéristique de la phase de mortalité. La mort d'une population bactérienne, comme sa croissance durant la phase exponentielle, est habituellement logarithmique.

II.5. Evolution de la matière organique en présence d'une masse bactérienne

Lorsqu'on apporte des matières organiques dans un milieu microbien, et si celui-ci n'est pas dépourvu en éléments nutritifs, on assiste à une évolution progressive de la masse microbienne suivant quatre phases principales (**figure II.2**).

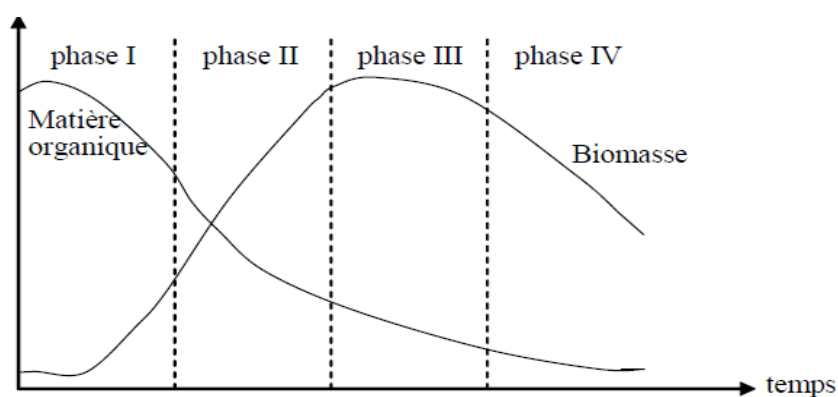


Figure II.2: Evaluation de la matière organique et de la biomasse en présence d'une culture bactérienne [40]

Au cours de la première phase, le milieu riche en nutriment permet un développement rapide des bactéries. La concentration de la matière organique diminue rapidement, la biomasse augmente alors que la masse d'oxygène présente dans le milieu décroît. C'est la phase de synthèse cellulaire au cours de laquelle, les matières organiques oxydées sont transformées en produits finaux de dégradations tels que CO_2 , H_2O , NO_2 ...

Au cours de la seconde phase, l'insuffisance de la nourriture entraîne un ralentissement de la croissance bactérienne, on observe alors un début du plafonnement de la biomasse. C'est la phase dite décroissante ralentie.

La phase III correspond à une phase stationnaire. Elle signifie qu'à ce moment, les bactéries utilisent les réserves accumulées précédemment.

Enfin, la dernière phase (IV), au cours de la quelle le milieu est pauvre en matières organiques, se traduit par la mort de nombreux micro-organismes. C'est la phase endogène. L'oxygène apporté est alors utilisé par les bactéries pour leur propre transformation en produits finaux.

II.6. Les techniques classiques de la mesure de croissance

Les deux méthodes de mesure de la croissance d'une population de microorganismes les plus couramment utilisées sont [41]:

- Le dénombrement de cellules viables sur boîte de pétrie.
- La mesure de la biomasse par turbidimétrie [42].

La première technique nécessite l'ensemencement par un échantillon de la suspension bactérienne d'une boîte de pétrie et une culture au terme de la quelle sont comptées les colonies (**figure II.3**). Cette technique suppose qu'à un microorganisme déposé au départ de pétrie correspond après culture exactement une colonie. La croissance est ainsi mesurée en unités formant colonie.

La méthode est très simple mais peut être coûteuse en temps et en matériel et peut conduire à l'obtention de cinétiques constituées d'un nombre limité de points expérimentaux.

La deuxième technique ne consiste pas à compter directement les cellules mais à mesurer la biomasse bactérienne. C'est-à-dire la masse cellulaire sèche totale [43]. L'augmentation de la biomasse bactérienne accompagnant la croissance d'une population de microorganismes entraîne l'opacification du milieu de culture, les techniques turbidimétriques permettent de suivre l'évolution de la biomasse bactérienne par la mesure de la densité

optique (DO). Cette variable définie comme logarithme du rapport entre l'intensité I_0 du faisceau incident et l'intensité I du faisceau transmis, caractérise l'opacité d'un milieu (**figure II.4**).

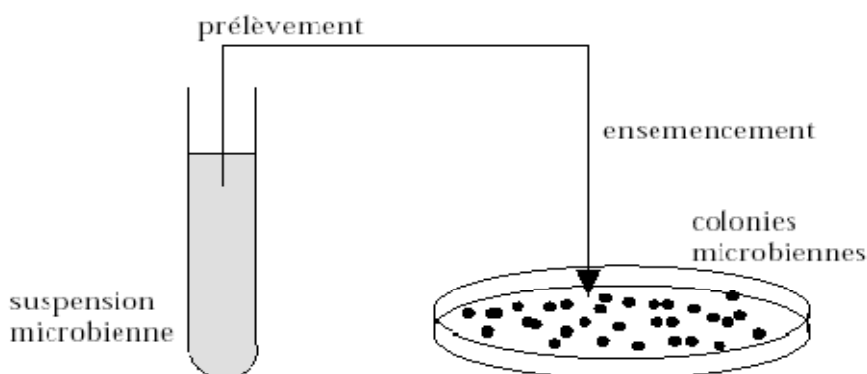


Figure II.3: Technique de traitement sur boîte de pétri [44]

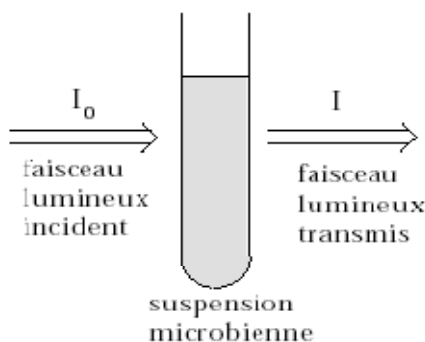


Figure II.4: Technique turbidimétrique de mesure de la biomasse [44]

II.7. Décoloration par les bactéries

II.7.1. Utilisation des cultures bactériennes pures

La décoloration et la minéralisation des colorants azoïques par les souches bactérienne est plus rapide par rapport au système de champignon, elle peut particulièrement utilisé des cultures mixtes, comme certain consortiums microbiens peuvent en commun effectuer des tache de biodégradation [45].

Les efforts d'isolement des cultures bactériennes pures capable de dégradées les colorants azoïques à commencés en 1970 en utilisant des *Bacillus Subtilis*, *aeromonas hydrophila* et *bacillus cereus*, récemment les recherches atteintes dans ce sujet sont réalisés à l'aide des cultures bactérienne pure [46]. Le **tableau II.1** reprend les différentes natures de colorant et leurs souches pures d'élimination.

Tableau II.1 : les différentes natures de colorant et leurs souches pures d'élimination

Nature de colorant et concentration	Nom de la souche	Temps (h)	Type d'enzyme
Rouge réactive 22 (200-600 mg/l)	<i>Pseudomonas luteola</i>	-	Réduction [47]
Différents colorants azoïques de 10 à 100 mg/l	<i>Aeromonas hydrophila</i> var 24B	24	Réduction [48]
Bleu réactive 13 à 200mg/l	<i>Pseudomonas</i> sp	70	pas disponible [48]
Vert réactive 19 à 50 mg/l	<i>Micrococcus glutamicus</i> NCIM 2168	42	Oxydation et réduction [49]
Orange réactive 96 et rouge réactive 120	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> en anaérobie	2	Réduction [50]
Orange réactive 16 à 100 mg/l	<i>Bacillus</i> genus	24	Réduction [51]

L'utilisation d'un système de culture pure assure des données reproductible, et l'interprétation des observations expérimentale devient plus facile, ainsi que la détermination détaillées des mécanismes de la biodégradation en utilisant les méthodes de biochimie, biologie moléculaire, et cette information pourrait être utile pour maîtrisé le système enzymatique, en sélectionnant des souches bactériennes ayant la meilleur activité enzymatique [52].

II.7.2. Utilisation des cultures bactériennes mixte

La décoloration bactérienne est efficace et rapide, mais les souches bactériennes isolées pures ne peuvent pas dégradées le colorant azoïque complètement, les produits intermédiaires sont des amines aromatiques cancérigènes qui doivent être décomposés [53], ainsi les systèmes de traitement composé par une population microbienne mixte atteint un degré plus élevé de biodégradation et minéralisation due à l'activité métabolique synergique de la biomasse microbienne, et ont des avantages considérables par rapport à l'utilisation des cultures pures à la dégradation des colorants azoïques synthétiques [54].

Dans le consortium microbien, les souches isolées peuvent attaquées les molécules de colorant par différentes positions, ou peuvent aussi utilisées les métabolites produits par ces souches pour une autres décomposition [55].

En générale au cours de la dégradation initiale de la liaison azoïque des colorants, il ya une formation des amines aromatiques qui sont toxiques à la nature. Cependant la présence du consortium microbien permet de les dégradées par des organismes complémentaires, ce processus est considéré utile et efficace [56]. Le **tableau II.2** reprend les différentes natures de colorant et leurs souches mixtes d'élimination.

Tableau II.2 : les différentes natures de colorant et leurs souches mixtes d'élimination

Nature de colorant et concentration	Organisme utilisé	Temps d'élimination	Type d'enzyme
Colorants azoïques	- <i>Bacillus cereuse</i> ; - <i>Sphaerotilus natans</i> ; - <i>Arthrobacter</i> sp ; - Boues activées en anaérobie	pas disponible	Réduction [46]
Orange acide 7 et rouge direct 254 de 60 à 300 mg/l	Culture mixte en anaérobie	50 jours	Réduction [57]
Noir réactive 5 à 116 mg/l	Boues activées	30 minutes	Adsorption [58]
Rouge de Méthyle de 20 à 30 mg/l	Culture mixte	16h	Réduction [59]
Rouge acide 7 de 30 à 60 mg/l	Culture mixte mutagène	140 h	

II.8. Mécanisme de la biodégradation des colorants :

Les composés azoïques sont susceptible à la dégradation biologique sous les conditions aérobies et anaérobies [54], en générale la dégradation microbienne de ces composés résulte la réduction de la liaison azoïque -N N- à l'aide de l'enzyme azo-réductase sous les conditions anaérobiques, elle implique le transfère de quarts électrons (réduction des équivalent), ceci est réaliser dans la liaison azoïque par l'intermédiaire de deux étapes, dans chaque étape deux électrons sont transférés au colorant azoïque auquel agit l'électrons accepteur final qui résulte une formation d'une solution colorée [52].

Les métabolites intermédiaires résultant (amines aromatiques) sont rapidement dégradés en conditions aérobie ou anaérobie [54]. Certain chercheurs proposent que généralement la présence de l'oxygène inhibe l'activité réductrice de la liaison azoïque, puisque la respiration en aérobie peut engendrer l'utilisation de NADH, ainsi empêchent le transfert d'électrons de NADH vers la liaison azoïque [59].

Il à été aussi rapportés que la décoloration en aérobie des colorants azoïques est un procédé avantageux ou le colorant azoïque peut agir comme un accepteur d'électrons [60], alternativement.

La décoloration doit être attribuée à une réaction extracellulaire non spécifique effectuée entre les composés réduits engendrés par la biomasse en aérobie. Dans les conditions d'anaérobie la perméabilité du colorant azoïque à travers la membrane cellulaire agit comme un facteur limitant pour la décoloration [61]. Sous les conditions d'aérobies les

enzymes mono et di-oxygénase catalysent l'incorporation de l'oxygène, à partir d'O₂ vers les cycles aromatique des composés organiques avant la rupture des cycles [62], certaines bactéries aérobies sont capable de réduire les composés azoïques à l'aide de l'oxygène catalysé par l'azo-réductase et produit les amines aromatiques [63], il a été aussi rapporté que l'azo-réductase en aérobie a pu utilisée les deux NADH(P) H et NADH ensemble comme des cofacteurs de la rupture par réduction n'est pas un substrat carboxyle pour la croissance de la bactéries mais une analogie structurale sulfonée, ce type d'activité (azo-réductase) est établit par les espèces pseudomonas des souches K22 et KF 46, ces bactéries ne peuvent pas utilisés le colorant azoïque comme un substrat de croissance, et exige l'addition d'une source de carbone organique [64], il ya quelque bactéries qui sont capable de croitre sur les composés azoïques comme une seule source de Carbone, ces bactéries coupe la liaison –N N- par réduction et utilise les amine comme une source de Carbone et d'énergie pour leurs croissances , ces organismes sont spécifiques (relié) vers leur substrats.

II.9. Facteurs affectés à la biodégradation :

La recherche à montrée que l'efficacité du système de traitement biologique est influencé par les paramètres opérationnelles : le niveau d'aération, la température, le pH et le potentiel redox doivent être optimisés pour avoir un taux de maximum réduction de teintures, les concentrations du donneur d'électron et l'intermédiaire redox doivent être équilibrés avec la biomasse en amont dans le système et la quantité de teinture présenté dans les eaux usées.

L'effet de chaque facteur sur l'élimination des teintures doit être examiné avant l'utilisation du système biologique pour traiter les eaux industrielle [65].

II.9.1. Oxygène:

Le facteur le plus important à considéré est l'effet de l'oxygène sur la croissance cellulaire et la réduction de colorant, au cours de la phase de croissance bactérienne l'oxygène a un effet significatif sur les caractéristiques physiologique des cellules. Au cours de l'étape de réduction de colorant quand le milieu cellulaire externe est en aérobie le potentiel élevé d'oxydo-réduction de l'électron accepteur, l'oxygène, peut inhibé le mécanisme de réduction des colorants, ceci parce que les électrons libérés de l'oxydation de l'électron donneur par les cellules sont préférentiellement utilisés pour réduire l'oxygène plutôt que ceux des colorants azoïques et le produit de réduction, l'eau, n'est pas un réducteur, aussi l'estimation des intermédiaires de la réaction de réduction, qui inclut la forme hydrazine des colorants, et la forme d'un radical libre des anions azoïques des colorants a tendance à être ré oxydé par l'oxygène moléculaire [66].

Ainsi pour un traitement efficace des eaux usées, deux étapes sont nécessaires pour l'application du processus, dans lequel l'oxygène est introduit après que la réduction initiale en anaérobiose de la liaison azoïque a eu lieu, l'équilibre aérobie anaérobiose dans ce système doit être contrôlé car il est possible que la ré-aération d'une solution colorée réduite peut causer au colorant de la solution de s'obscurcir, cela doit être attendu comme les produits aromatiques aminés, lorsque les colorants azoïques sont réduits en anaérobiose, ils sont spontanément instables, en présence d'oxygène cela aboutit à l'oxydation des groupes hydroxyles et aminés aux quinone amines, les composés comme ceux-ci peuvent subir une polymérisation, menant au développement de nouveaux colorants chromophores obscurs qui est un sous-produit indésirable (nocif) [67].

II.9.2. Température

Dans beaucoup de systèmes, le taux d'élimination des colorants augmente avec l'augmentation de la température, dans une gamme bien définie qui dépend du système, pour avoir un taux maximal d'élimination du colorant la température exigée tend à correspondre à la température optimale de la croissance des cultures cellulaires de 35°C à 45°C.

La diminution de l'activité d'élimination des colorants aux températures élevées peut être attribuée à la perte de viabilité cellulaire ou la dénaturation de l'enzyme azo-réductase. [66].

II.9.3. Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH optimum pour l'élimination du colorant est estimé à une valeur de pH neutre ou pH légèrement alcalin et le taux d'élimination de colorant a tendance à diminuer rapidement à des valeurs du pH fortement acide ou fortement alcalin en conséquence les eaux usées colorées sont souvent réservées pour améliorer la performance de l'élimination du colorant par la culture cellulaire.

La réduction biologique de la liaison azoïque peut résulter d'une augmentation du pH due à la formation des métabolites des amines aromatiques qui sont plus basiques que les composés azoïques originaux [68], le changement du pH dans une gamme de 7 à 9,5 a un très faible effet sur le processus de réduction des colorants, il a été trouvé que l'estimation du taux de réduction des colorants a augmenté près de 2,5 à un pH élevé de 5 à 7, tandis que ce taux devient insensible aux pH de la gamme 7 à 9,5 [66].

II.9.4. concentration de colorant

La concentration du substrat colorant peut influencer sur l'efficacité d'élimination du colorant par une combinaison de facteurs incluant la toxicité du colorant à des concentrations élevées, et la capacité de l'enzyme à identifier le substrat à des concentrations très faibles qui peuvent exister dans certaines eaux usées, en effet la constante de la cinétique qui mesure l'efficacité du processus, en commun avec d'autres enzymes catalysé par le processus peut être décrite par la cinétique de MICHAELIS-MENTEN.

$$V = V_{\max} [S] / K_m + [S]$$

- V: la vitesse de la réaction à une vitesse de substrat [S].
- $V_{\max}$: la vitesse maximum à une concentration de substrat.
- K_m : constante MICHAELIS.

L'application de la cinétique MICHAELIS permet aux prévisions d'assurer une efficacité au processus en incluant le chargement de la capacité de la biomasse ou la température opérationnelle nécessaire pour assurer l'élimination du colorant à une efficacité donnée dont les contraintes déterminées par le volume du réacteur disponible, la composition de la solution de base et les débits.

WUHRMAN a observé que après une réduction initiale et rapide de colorant, le taux d'élimination de colorant a diminué plus rapidement que serait prévu par une réaction du premier ordre [46]. Cet effet est attribué à la toxicité du métabolite qui a été formé pendant la réduction de colorant, plus la concentration du colorant est élevée, plus le temps nécessaire d'élimination est long.

Sani et al. trouve que les colorants avec les concentrations de 1 à 10 μM ont été facilement décolorés, mais quand la solution du colorant a été augmentée à 30 μM , l'élimination du colorant a été réduite [69].

Cependant, DUBIN et WRIGHT ont annoncé l'absence tout effet de concentration sur le taux de réduction, cette observation est compatible avec le mécanisme de la réduction non-enzymatique qui est contrôlé par le processus qui sont indépendants de la concentration de colorant [70].

II.9.5. Structure de colorant

Quelque colorant azoïque sont plus résistant à la dégradation par les cellules bactériennes [71], les colorants avec des structures simples et de faible poids moléculaire présente des taux de dégradation élevés, tan disque les colorants très substitué et de poids moléculaire élevés leur dégradation est plus difficile [72].

Dans le cas du mécanisme de réduction non-enzymatique terminal, le taux de réduction est influencé par les échanges de la densité des électrons présents dans les groupes azoïques, la substitution des électrons cédés par les groupes (-SO₃H, -SO₂NH₂) en position para des cycles phényle relié à la liaison azoïque, cause une augmentation du taux de réduction [72].

NIGAM et AL établis que les composés azoïques liés avec un groupe hydroxyle ou amine sont susceptibles d'être dégradées que ce liées avec le méthyle, methoxy, sulfoné ou les groupes nitro [45].

L'élimination de la couleur est aussi liée aux nombre de liaison azoïque dans la molécule de colorant, la couleur des colorants mono azoïques est éliminée plus rapidement qu'une couleur des colorants diazoïque ou tri azoïque. HU à montré que le taux d'élimination des colorants mono azoïques à augmenté avec l'augmentation de la concentration de colorant, tandis que le taux d'élimination des colorants diazoïques et tri azoïques est resté constant quand la concentration de colorant à augmenté [73]

Un nombre de chercheur à corrélé le niveau de taux d'élimination avec la classe du colorant plutôt qu'avec les caractéristiques moléculaires [74].

HITZ à conclu que:

- les colorants acides, ont un taux d'élimination faible à cause aux nombres des groupements sulfoné dans les colorants.
- les colorants directs, ont un taux d'élimination élevé qui est indépendant du nombre de groupe sulfoné dans
- Les colorants réactives, ont un taux d'élimination faible [75].

La présence des groupes sulfoné empêche le transfert la molécule de colorant à travers la membrane cellulaire, si la réduction du colorant à eu lieu à l'intérieure de la cellule, donc le taux de réduction de colorant diminuera avec l'augmentation du nombre de

groupes sulfoné, cependant si la réduction a eu lieu à l'extérieure de la cellule, la présence de groupe sulfoné aura peu d'effet sur le taux de réduction.

KULA a constaté que les cultures pourraient être adaptées pour produire les enzymes azo réductase qui avaient une spécificité très élevée vers les structures de colorant particulière une telle enzyme, orange I azo réductase et ses dérivées a exclusivement réduit les groupes azoïques de l'orange I et ses dérivées avec leur groupes hydroxydes dans la position para.

On a aussi montré que les colorants sulfoné ont été réduit plus rapidement que les colorants carboxyle à cause de l'électronégativité élevée du groupe sulfoné, qui rend le groupe azoïque plus accessible aux électrons [76].

La position et la nature des substituant dans la molécule de colorant influencent les hydrazines azoïques tautomériques (migration d'un atome d'hydrogène accompagné d'un changement de la localisation d'une liaison double) des composés hydroxyde azoïque, le proton hydroxyle de dérivés phényle azoïque est instable et peut se lier avec l'atome nitrogène du groupe azoïque causant un équilibre tautomérique rapidement formé entre les formes azoïque et l'hydrazone, cet équilibre est influencé par des facteurs structurels dans la molécule et par la nature du milieu entourant la molécule.

II.9.6. L'électron donneur

L'oxydation de l'électron donneur organique et/ou l'hydrogène est couplé au processus d'élimination de colorant, BRAS et al a montré que l'addition de l'électron donneur comme le glucose ou des ions acétates, stimule la coupure de la liaison azoïque par réduction [71].

La thermodynamique des différents électrons donneurs de la demi-réaction est différente, donc le taux de réaction va être probablement influencé par le type de l'électron donneur [77], il est important de déterminer la physiologie de l'électron donneur pour chaque processus biologique de biodégradation de colorant, ceci augmentera non seulement le taux de réduction de colorant, mais il donnera aussi une indication sur la voie enzymatique responsable de la réaction de la réduction.

Les coenzymes-réducteur équivalents qui sont impliqués dans le transport d'électrons normaux par l'oxydation des substances organiques peuvent agir en tant que des donneurs d'électron pour la réduction des colorants azoïques [78].

II.9.7. potentiel d'oxydoréduction :

L'élimination de colorant dépend du potentiel d'oxydoréduction des donneurs et accepteurs d'électron, par ce que l'étape de contrôle de vitesse implique un équilibre entre le colorant et l'agent réducteur extracellulaire. Le potentiel d'oxydoréduction est une mesure de facilité, avec laquelle une molécule accepte des électrons et peut être réduite, par conséquent plus le potentiel est positif, plus la molécule est réduite rapidement.

BRAGER et al ont montré qu'il existe une relation linéaire entre le logarithme de l'élimination des colorants et le potentiel de (half-ave) de substrat [79], cette corrélation électrochimique du substrat de colorant suggère que l'étape pour déterminé la cinétique dans la réduction bactérienne du colorant n'implique pas un phénomène de structure spécifique, comme la pénétration sélective membranaire ou de l'enzyme lié [70].

L'application des potentiel faible d'oxydoréduction (< -400 mV) pour le système, dans les conditions anaérobies est nécessaire pour avoir un taux élevé d'élimination de colorant, et il à un effet sur le profile de métabolites qui sont généré pendant le processus de réduction [80].

Le taux d'élimination de colorant est élevé lorsque le potentiel d'oxydoréduction du système est plus négatif, et il diminue lorsque le potentiel d'oxydoréduction du système augment [60].

II.9.8. L'intermédiaire d'oxydo -réduction :

Comme il est peu probable que les colorants très chargé en sulfate passeront à travers la membrane cellulaire, la réaction de réduction des colorants doit impliquer la réduction de l'activité cellulaire [81], cette activité de réduction est réalisé en utilisant des composés intermédiaire d'oxydoréduction, comme les flavines qui transporte les échange de réduction à partir des cellules pour facilité la réduction non-enzymatique extracellulaire de colorant azoïque [78].

Une faible concentration de l'intermédiaire d'oxydoréduction est suffisante pour la réalisation du transfert d'électron, l'intermédiaire d'oxydoréduction est caractérisé par le potentiel d'oxydoréduction estimé de 200 à 300 mV [82], l'ajout des électrons synthétique entraine l'augmentation de la vitesse de réduction des colorants azoïques par les cellules bactériennes, les couples oxydo-réducteur quinone-hydroquinone agissent comme des intermédiaires d'oxydoréduction [81] le quinone transfert un électron de réduction vers le

radical hydroquinone ou deux électrons de réduction vers l'hydroquinone pour la réduction des colorants azoïques.

La réduction d'un radical anionique est réalisée par une réaction avec un transfert rapide d'un seul électron suivi par un deuxième transfert lent d'électron qui résulte la production d'un anion stable [83], ce hydroquinone est ensuite oxydé par le colorant dans une réaction chimique directe [77], l'application des quinones naturels biodégradables comme Lawsons, qui est une technique qui à un bon rendement pour le système de traitement et d'élimination des colorants, car le taux de réduction augmente sans additionner aucune substance nuisible à l'environnement [84].

Chapitre III

MATERIELS ET METHODES

III.1. Introduction

La biodégradation des colorants synthétiques utilisés dans laboratoire (méthyle orange, bleu et le rouge) par des bactéries d'origine végétale nécessite la présence de matériel consommable, ainsi que des appareils pour l'analyse des produits dégradés.

III.2. Matériels et produits

III.2.1. Matériels utilisés: le tableau III.1, recense les marques des techniques instrumentales utilisées.

Tableau III.1: liste des appareils utilisés.

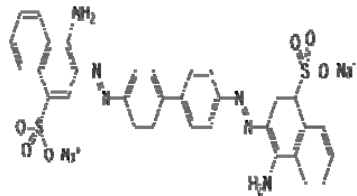
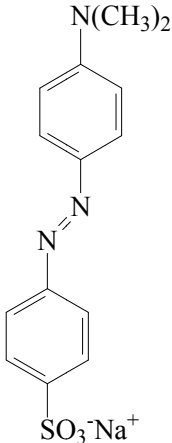
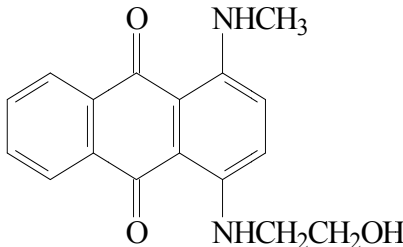
Appareil	Marque
Chromatographe liquide à haute performance	Agilent type 1200
Chromatographie ionique	DIONEX type ICS 3000
Spectrophotomètre UV visible	Shimadzu
Microscope photonique	Motic
Centrifugeuse	Hettich EBA
Microscope	Motic
Autoclave verticale	WOLF
pH mètre	Hanna
Etuve microbiologique	Binder

III.2.2. Propriétés des produits utilisés: le tableau III.2 et III.3, résume les propriétés des produits et colorants utilisés.

Tableau III.2: listes des produits utilisés

Produit	Paramètre
Gélose nutritive	Idéal labo à conserver entre (2-8°C)
Gélose nutritive inclinée	Gélose inclinée dans des tubes à essais stérilisés
Milieu nutritif et d'enrichissement	Milieu minimum (MM)
Méthyle orange	Panreac
Rouge sirius	Panreac
Bleu cibacete	Panreac
Galerie API 20 E	bioMérieux SA

Tableau III.3: les propriétés physico-chimiques des colorants étudiés

Nom	Rouge du Congo	Méthyl Orange	Bleu CIBAACETTE
Famille	Azoïque	Azoïque	Azoïque
Color index	22120	13025	16273
Formule brute	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$	$C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$	$C_{17}H_{16}N_2O_3$
Appellation chimique	acide benzidinediazo-bis-1-naphtylamine-4-sulfonique	4-dimethyl amino azo benzène-4'-sulfonic acid sodium salt	1-methylamino-4-(Beta-Hydroxyethylamino) Anthraquinone
Masse molaire (g/L)	696,66	327,33	296.32
Structure chimique			

III.3. Méthodes expérimentales

III.3.1. Préparation de l'échantillon

Dans une zone aseptique près d'un bec benzène, en utilisant un matériel stérilisé (le mixeur, verrerie...), la betterave est mixée avec de l'eau distillée, après l'avoir bien lavée.

L'échantillon préparé, permet de suivre la biodégradation de colorant utilisé et la préparation de la biomasse bactérienne, l'échantillon est filtré avec le papier filtre, stérilisé pour éviter toute contamination.

III.3.2. Préparation de la biomasse bactérienne

Après avoir laver, sécher et stériliser tout le matériel à utiliser, sur une pailleasse bien désinfectée avec l'hypochlorite de sodium, près d'un bec benzène, un volume de 100 ml de l'échantillon est mis dans un flacon de 200 ml, et incubé dans une étuve bactériologique a 37 °C pendant 24h jusqu'a 36h, puis centrifugé à 5000 tours/minutes pendant 20 minutes. Le surnagent est éliminé en récupérant le culot (la biomasse) au fond du tube.

III.3.3. Méthode de dénombrement des souches

Dans un autoclave, la gélose nutritive est incubée à 120°C pendant 20 minutes, sur une paillasse aseptique près d'un bec benzène la gélose stérilisée, liquéfiée est coulée dans 30 boîtes de pétri, jusqu'à solidification de la gélose.

La biomasse récupérée et les boîtes de pétri coulées devront être utilisées pour l'ensemencement des souches suivant la méthode de dilution citée en annexe.

Les boîtes ensemencées sont incubées dans une étuve bactériologique à 37°C pendant 24h.

III.3.4. Isolement et purification des souches

Les souches sont isolées, les une des autres, selon leur aspect : forme, taille, bord, surface et élévation ; chaque type de colonie bien isolée est repiqué sur gélose nutritive, puis incubée à 37°C pendant 24h.

III.3.5. Examen direct à l'état frais des souches

Après 24 h d'incubation, les souches sont observées sous microscope photonique après préparation du frottis comme suite:

- déposer sur une lame une goutte d'eau distillée.
- prélever une colonie bien isolée et l'étaler sur la goutte d'eau.
- fixer le frottis en mettant la lame près du bec benzène jusqu'au séchage.
- observer la lame sous un microscope de grossissements $G \times 40$.

Pour les autres souches, on choisit des colonies isolées de morphologie différentes, en suivant les mêmes étapes précédentes.

III.3.6. Sélection des souches :

Pour sélectionner des souches pures un repiquage a été réalisé, de la gélose nutritive à la gélose Hektoen, ces boîtes seront incubées à 37°C pendant 24 h dans une étuve bactériologique.

Après 24h les souches seront identifiées selon les étapes suivantes:

- Coloration de gram ;
- Tests biochimiques classiques ;
- Analyse par Spectrophotométrie ;
- Analyse par Chromatographies en phase liquide ;
- Analyse par Chromatographies Ionique.

III.3.6.1. Coloration de gram

La coloration de gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne pour la classification des bactéries.

- Préparer le frottis en déposant sur une lame propre une goutte d'eau distillée, puis on prélève une colonie bien isolée, et en l'étale sur la goutte d'eau, on fixe le frottis en plaçant la lame près du bec benzène jusqu'au séchage.
- Recouvrir la lame de la solution de cristal violet pendant 1 min.
- Incliner la lame et éliminer le cristal violet à l'aide de lugol. Remettre la lame horizontale et recouvrir de lugol. Laisser agir 1 min.
- Laver à l'eau.
 - Faire couler sur la lame l'Alcool ou l'Alcool-Acétone jusqu'à disparition du Violet.
 - Laisser agir quelques gouttes de Fuchsine 1 min..
 - Laver.
 - Sécher.
- Observer au microscope à immersion à l'objectif G X 100. Une goutte d'huile déposée entre le frottis et l'objectif donne une image plus nette.

Les bactéries gram⁺ apparaissent en bleu foncé ou violet, les gram⁻ en rose ou rouge [83].

III.3.6.2. Tests biochimiques classiques

Grace à ces tests il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées les tests biochimiques permettant donc de vérifier si la bactérie a un métabolisme oxydatif ou fermentatif, s'il y a formation d'un acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de Carbone (exemple : glucose, arabinose, sorbitol), si un composé particulier est utilisé comme seule source de Carbone (exemple : citrate, malonate), si un acide aminé peut être transformé (exemple : arginine, lysine, tryptophane), si un enzyme particulier est présent (exemple : oxydase, catalase, pétrinase) ou si des molécules complexes sont dégradées (exemple gélatine, amidon).

a) Galerie biochimique

Une série de tests permet de reconnaître les caractères biochimiques des souches bactériennes à identifier, les techniques et les principes de ces tests biochimiques (choisi en fonction de, TSI, Mannitol/Mobilité, Urée/Indole, disque ONPG, Clark et Lubs (RM, VP), nitrate, Citrate Simmons).

Pour une identification plus précise, on utilise la galerie API 20 E qui contient d'autre test biochimique.

b) Galerie API20 E

C'est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques destinés à l'identification des Enterobactériaceae. Ce système regroupe 23 tests biochimiques des substrats déshydratés qui sont contenus dans des micros tubes. Ces substrats déshydratés qui sont contenus dans des micro tubes. Ces substrats sont mis en solution grâce à l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier, à la suite d'une période d'incubation (24h à 37c°) permettant à la bactérie de réagir avec les substrats.

Les diverses réactions sont notées afin de déterminer le code d'identification de 07 chiffres ou à l'aide d'un logiciel.

III.3.6.3. Spectrophotométrie

La mesure de l'opacification du milieu de culture est une technique très prisée pour mesurer la biomasse, c'est-à-dire la masse bactérienne sèche présente par unité de volume (ML-3) (**figure III.1**). Il est en effet possible d'utiliser une loi, analogue à celle de Béer-Lambert, exprimant la proportionnalité entre la contribution bactérienne à l'absorbance du milieu A et la biomasse B présente en solution,

$$A = \text{Log} (I_0 / I_2) - \text{Log} (I_0 / I_1) = \text{Log} (I_1 / I_2) = \alpha d B$$

Où I_0 : représente l'intensité lumineuse du rayon incident,

I_1 : l'intensité du rayon transmis en l'absence de biomasse,

I_2 : l'intensité du rayon transmis en présence de biomasse,

d: la longueur du trajet optique, et α un coefficient de proportionnalité.

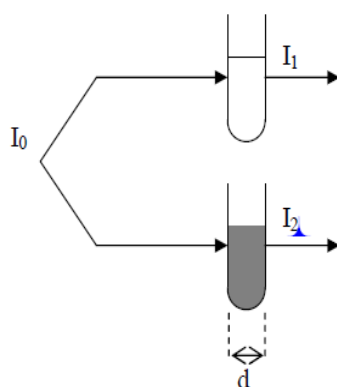


Figure III.1: Schéma pour définir la densité optique du milieu [85].

L'absorbance est rapportée conventionnellement à un trajet optique de 1 cm pour définir la densité optique (DO) du milieu:

$$DO = (1/d) \text{Log} (I_1 / I_2) = \alpha B$$

L'absorbance ou la turbidité d'une culture est souvent déterminé par spectrophotométrie, l'échantillon est placé dans une cuvette ensuite on place la cuvette dans le spectrophotomètre, les micro-organismes jouent le rôle d'une barrière physique pour la lumière. Si on choisi une longueur d'onde bien déterminée le taux de la lumière transmise par l'échantillon sera proportionnel à la quantité des microorganismes présents dans l'échantillon (**Figure III.3**).

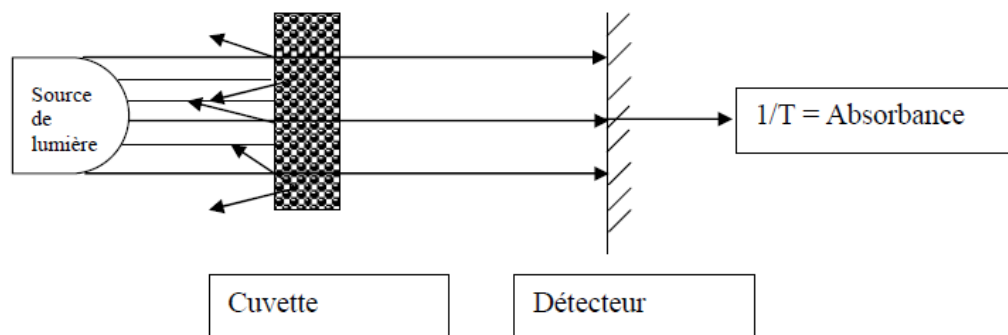


Figure III.2: Schéma de l'absorbance

L'absorbance de la culture est généralement mesurée à une longueur d'onde autour de 600 nm, la densité optique d'une culture cellulaire est mesurée par l'absorbance à une longueur d'onde de 620 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible de type « SHIMADZU ».

a) dosage de la biomasse

L'augmentation du nombre des microorganismes dans la solution entraîne une augmentation de la turbidité de la solution. Ce nombre est proportionnel à la densité optique de la solution. Les mesures des densités optiques pour la détermination de la concentration des microorganismes sont réalisées à 600 nanomètres [86].

b) Mesure de l'absorbance

Les concentrations en colorants sont déterminées par mesures de L'absorbance grâce à un spectrophotomètre UV. Visible de type « SHIMADZU ».les longueurs d'ondes retenues par balayage varient de 600 à 300 nm. En effet, dans un domaine de concentration allant de 0 jusqu'à 40mg/l les solutions des colorants obéissent à la loi de Berr-Lambert. Pour mesurer la concentration en colorant, il il suffit de prélever un échantillon du surnageant après centrifugation de 5000tr/min pendant 20 minutes à l'aide d'une centrifugeuse.

III.3.6.4. Chromatographies en phase liquide

La chromatographie liquide haute performance, est une méthode de séparation, non destructrice en son principe, basée sur le fait que le coefficient de partage d'un soluté entre deux phases dépend de la nature du soluté, et donc, si l'une des phases est mobile par rapport à l'autre,

les solutés mettront un temps plus ou moins long à parcourir le chemin imparti à cette phase mobile [87].

L'échantillon doit être totalement soluble dans la phase mobile qui sera appelé solvant d'élution (solvant ou mélange de solvants). Celui-ci doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges.

Pour suivre la biodégradation des colorants en fonction du temps, une injection de la solution de colorant (10^{-4} M) a été effectuée sur un chromatographe de type Agilent type 1200 équipé d'une pompe fonctionnant en deux modes (isocratique et gradient d'élution), d'un passeur d'échantillon automatique, d'un détecteur UV-Visible à barrette de diode et d'une colonne de type Eclipse XDB C18 ($5,0\ \mu\text{m}$, $4,6 \times 150\ \text{mm}$). La phase mobile est constituée de méthanol (20%), eau (75%) et Acétonitrile (5%), débit est de $0,8\ \text{mL/min}$ et longueur d'onde de détection est de $540\ \text{nm}$.

III.3.6.5. Chromatographies Ionique

La chromatographie par échange ionique ou chromatographie ionique (CI) représente un sous-groupe de l'HPLC. Selon l'IUPAC, la chromatographie par échange ionique est définie de la manière suivante [88]:

«La séparation en chromatographie par échange ionique est basée sur les différences d'affinité d'échange ionique des différents analytes. Lorsque des ions inorganiques doivent être séparés et détectés à l'aide d'un détecteur de conductivité ou par détection UV indirecte, on appelle cela de la chromatographie ionique».

Une autre définition plus ancienne de la chromatographie ionique paraît plus appropriée [89]:

«La chromatographie ionique regroupe toutes les séparations rapides de chromatographie liquide d'ions sur des colonnes en couplage on-line avec un détecteur à cellule continu permettant détection et quantification.»

Ces analyses sont effectuées par chromatographie ionique. Cette méthode chromatographique est orientée vers la séparation des ions et des composés polaires.

L'analyse des anions a été réalisée par Chromatographie Ionique DIONEX type ICS3000, avec passeur d'échantillons, équipé d'un détecteur de conductivité, utilisant une colonne AS19 comme phase stationnaire et KOH phase mobile. Le débit a été fixé à $1\ \text{mL/min}$ et le volume injecté est $10\ \mu\text{L}$.

L'analyse des cations a été réalisée par le même équipement, avec une colonne CS12 comme phase stationnaire et Acide méthanosulfonique (MSA) comme phase mobile. Le débit a été fixé à $1\ \text{mL/min}$ et le volume injecté est $10\ \mu\text{L}$.

Chapitre IV

RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Etude microbiologique

IV.1.1. Etude microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes: après une observation à l'état frais et après coloration de Gram. Les résultats obtenus sont donnés dans le **tableau IV.1**.

Tableau IV.1: Aspects microscopiques des souches isolées

Examen	Paramètre	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
Morphologie des colonies sur GN	Consistance	Crémeuse (opaque)	Sèche (opaque)	Translucide Crémeuse	Visqueuse (opaque)
	Taille	Très fine	Très fine	Très fine	moyenne
	Couleur	Crème	Crème	Crème	Crème
	Forme	Ronde Convexe	Ronde Convexe	Ronde Convexe	Irrégulière Convexe
Gram	Coloration de gram	-	-	-	+
Sous microscope	Mobilité	+	+	+	+
	Agencement	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Bacillus

Les résultats consignés dans le **tableau IV.1**, montrent une variété de types bactériens isolés sont mobiles. Elles présentent différentes formes: bacille, coccobacille. Elles présentent aussi une paroi de Gram positive ou négative.

Les photos ci-dessous (**figure IV.1 à figure IV.10**) montrent les morphologies et la coloration de gram des souches (S) sur gélose nutritive (GN):

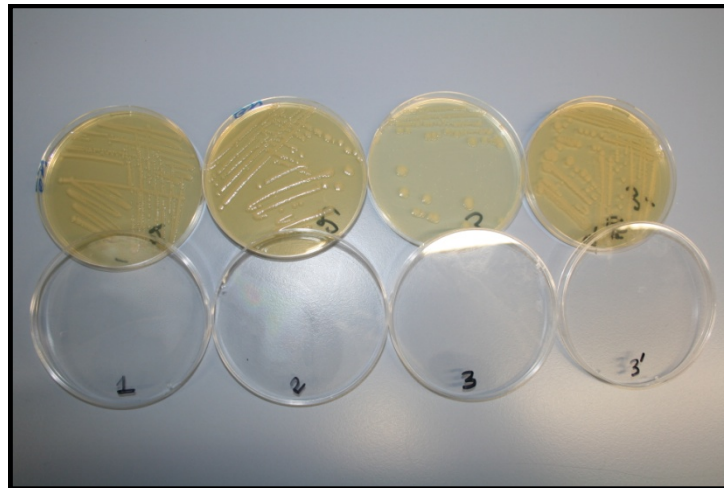


Figure IV.1 : les 4 souches sur GN



Figure IV.2: S1 sur GN

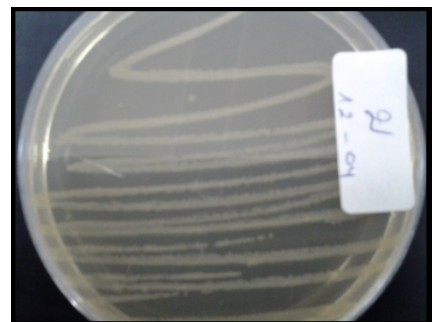


Figure IV.3: S2 sur GN

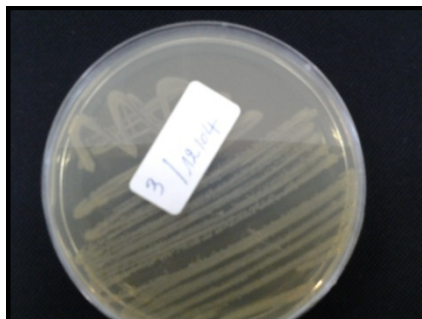


Figure IV.4: S3 sur GN

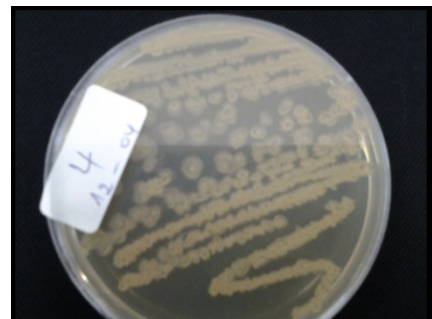


Figure IV.5: S4 sur GN

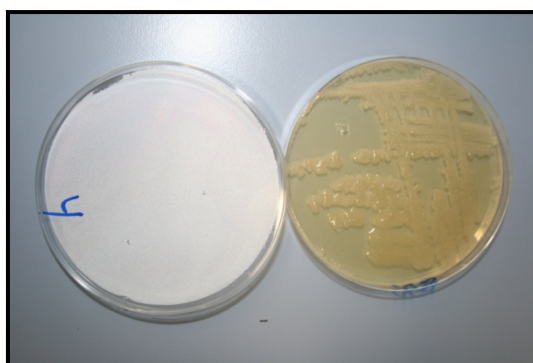
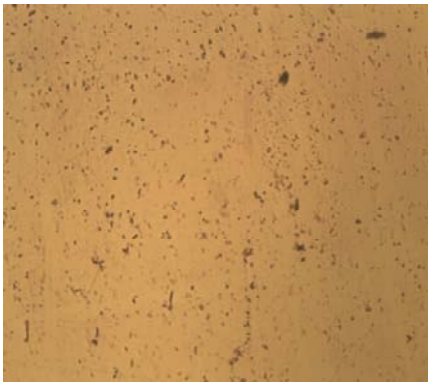
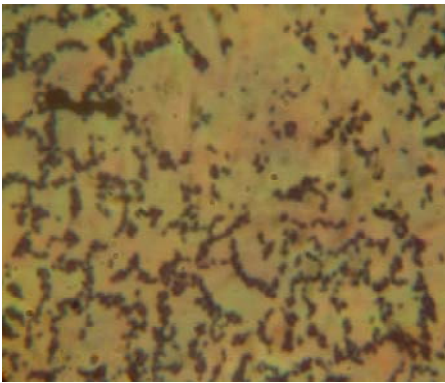
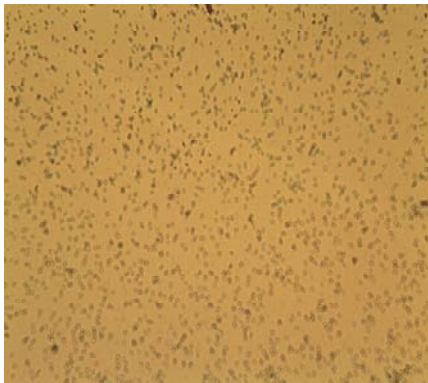
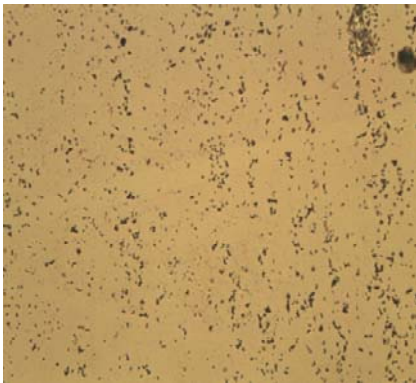


Figure IV.6: S4 sur GN (pré identification)

	
Figure IV.7: Coloration de Gram de la souche 1	Figure IV.8: Coloration de Gram de la souche 2
	
Figure IV.9: Coloration de Gram de la souche 3	Figure IV.10: Coloration de Gram de la souche 4

IV.1.2. Tests biochimiques

a) Identification par la galerie biochimique classique

Les photos obtenues montrent la galerie biochimique avant et après 24 heures d'incubation à 37 °C sont rassemblés en **annexe A** et les résultats des tests biochimiques sont représentés dans le **tableau IV.2**.

D'après les résultats présentés dans le **tableau IV.2**, la totalité des souches sont catalase positive alors que le caractère oxydase négative n'est pas un critère général, il ya de souche 4 qui est oxydase positive.

Tableau IV.2: résultats des tests biochimiques

Réactif	Caractère	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
VF	Type respiratoire	AAF	AAF	AAF	AAF
Disque oxydase	Oxydase	-	-	-	+
Eau oxygéné	Catalase	+	+	+	+
TSI	lactose	+	+	+	+
	Saccharose	+	+	+	+
	Glucose	+	+	+	+
	Gaz	+	+	+	-
	H ₂ S	-	-	-	-
Mannitol/Mobilité	Mannitol	+	+	+	+
	Mobilité	+	+	+	+
Urée/Indole	Uréease	-	-	-	-
	Indole	+	-	-	+
	T.D.A	-	-	-	-
Disque ONPG	ONPG	+	+	+	-
Clark et lubs	RM	-	+	-	+
	VP	+	-	-	+
Nitrate	Nitrate réductase	+	+	+	-
	Nitrite réductase	-	-	-	+
Citrate de Simmons	Utilisation des citrates	-	-	-	+
Témoin		-	-	-	-
ODC		+	+	+	-
LDC		+	-	-	-
ADH		-	+	+	-

b) Identification par la galerie API20E

Les photos suivantes (**figure IV.11 et IV.12**) montrent la galerie API20E après et avant incubation à 37c°

**Figure IV.11 :** Api 20E avant incubation**Figure IV.12:** Api 20E après incubation

Les résultats de l'identification par la galerie biochimique classique sont représentés dans le **tableau IV.3**.

Tableau IV.3: Résultats de l'identification par la galerie biochimique classique

Tests	Composants actifs	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
ONPG	2-nitrophényl-D-galactopyranoside	+	+	+	-
ADH	L-arginine	+	+	+	+
LDC	L-lysine	-	-	+	-
ODC	L-ornithine	+	+	+	+
CIT	citrate Trisodique	+	-	-	-
H ₂ S	Thiosulfate de Sodium	-	-	-	-
URE	Urée	-	-	-	-
TDA	L-tryptophane	-	-	-	+
IND	L-tryptophane	-	-	-	+
VP	Pyruvate de Sodium	+	+	+	-
GEL	Gélatine	-	-	-	-
GLU	D-glucose	+	+	+	+
MAN	D-mannitol	+	+	+	+
INO	Inositol	-	-	-	+
SOR	D-sorbitol	+	+	+	+
RHA	L-rhamnose	+	+	+	+
SAC	D-saccharose	+	+	+	+
MEL	D-melibiose	-	-	+	-
AMY	Amygdaline	+	-	+	-
ARA	L-arabinose	+	-	+	-

D'après les tests précédents les souches S1, S2 et S3 ont été rattachées à la famille des Enterobacteriaceae et présentent les caractéristiques suivantes: une forme bacillaire à Gram négatif, catalase positive, oxydase négative et fermentent le D-Glucose. L'étude des caractères biochimiques, nous a permis de rattacher la souche S1 et S3 au Genre Enterobacter, quant à la souche S2, elle pourrait appartenir au genre Cedecea.

En se basant sur les tests biochimiques de la souche 1, LDC et uréase négatives, citrate positif, oxyde les sucres, ne produit pas H₂S, indole et VP positifs, nous pouvons supposer que la souche S1 appartienne à l'espèce *E. cloacae* [90].

Selon A. OULD BOUDIA (2011), La comparaison les taux de CO₂ a indiqué l'ordre de biodégradabilité suivant: *Enterobacter cloacae* > *Pseudomonas spp* > *Escherichia coli*. Ceci montre que la souche d'*Enterobacter cloacae* est capable de mieux assimiler les substances pétrolières.

La souche bactérienne S4 est mobile, capable de fermenter le D-Glucose, elle est ONPG négative, LDC, ADH, ODC, indole et VP négatives. La souche 4 ne répond pas aux caractères biochimiques de L' API20E, il est nécessaire d'utiliser une API spécifique pour l'entérobactérie à Gram positifs

Compte tenu les résultats de traitement numérique avec logiciel spécifique, l'espèce serait *Lapagei* pour la souche S2 et *Aérogènes* pour la souche S3. Le **tableau IV.4** résume la classification des souches bactériennes par résultats de l'API 20 E.

Tableau IV.4: classification des souches bactériennes par résultats de l'API 20 E

Bactérie	Famille	Genre	Espec
Souche 1	Entérobactériaceae	Entérobacter	Cloacea
Souche 2	Entérobactériaceae	Cedecea	Lapagei
Souche 3	Entérobactériaceae	Entérobacter	aerogenes

IV.2. Cinétique de la biodégradation des colorants par les souches bactériennes

Pour obtenir des informations significatives sur la biodégradation des colorant synthétique utilisés dans laboratoire (méthyle orange) et dans l'industrie textile (bleu et le rouge) par des bactéries d'origine végétale, toutes les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions. Nous avons choisi de travailler à une concentration de 40mg/l pour tous les colorants et à la température 37 °C.

La stratégie appliquée dans le cadre de ce travail gravite autour de plusieurs paramètres à savoir: le taux de dégradation, la croissance bactérienne et la variation du pH en fonction du temps.

IV.2.1.Cinétique de la biodégradation du méthyle orange par les souches bactériennes

La cinétique, était toujours considérée comme l'un des facteurs déterminant de l'efficacité et de la faisabilité d'un traitement quelconque. Les résultats obtenus sont rassemblés dans l'**annexe B** Les taux de dégradation du méthyle orange par les souches bactériennes en fonction du temps sont décrits par la (**figure IV.13**)

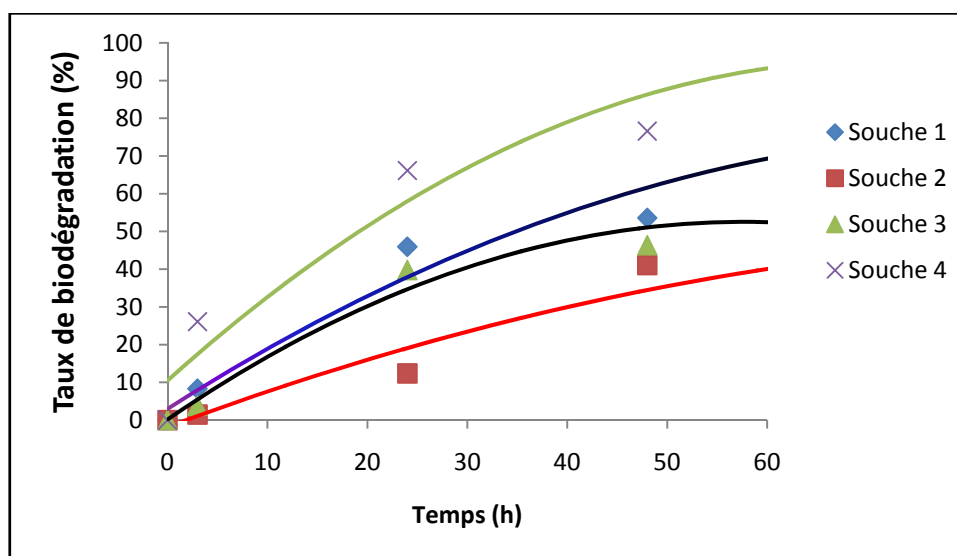


Figure IV.13: Variation du taux de biodégradation du méthyle orange par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

D'après la **figure IV.13** nous constatons que la souche 4 est la meilleur souche qui a donné un taux maximal de biodégradation du MO 98.75% comparé aux souches 1, 2 et 3 qui ont des taux de biodégradation du MO 76.90% , 42.07% et 98% respectivement (**figure IV.14**).

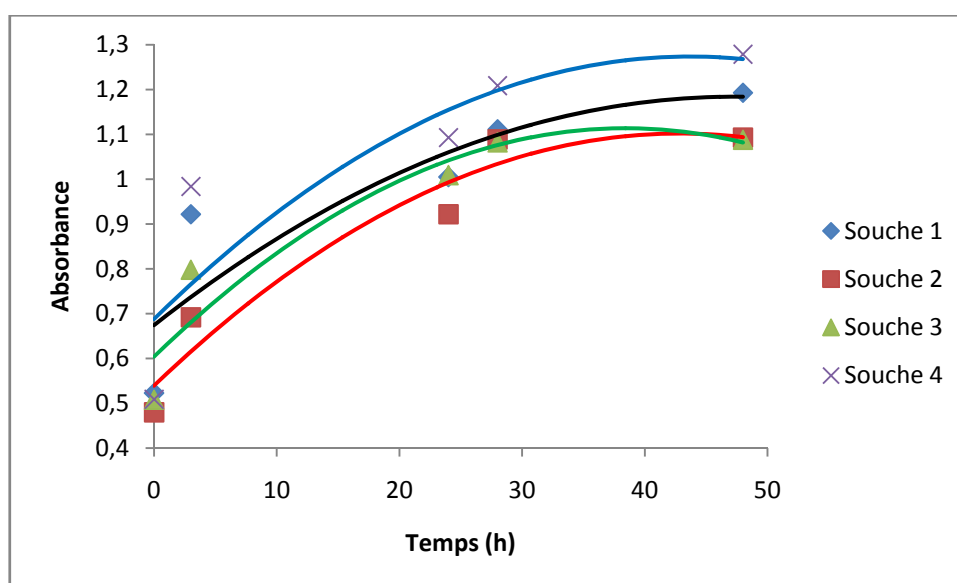


Figure IV.14: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du méthyle orange par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

On observe également une croissance rapide pour les souches durant 24h. La biomasse continue de croître jusqu'à 48h de culture pour atteindre leur maximum et puis se stabilise en fin de culture.

Les souches se développent en milieu liquide en formant des mycéliums libres de couleur blanchâtre visible à l'œil.

Au delà des 48h à 72h de culture la biomasse à augmenter dans le milieu, cependant, les vitesses spécifiques de croissance marquent un ralentissement de la croissance. Selon Martin et Demain (1980), la séparation entre la phase exponentielle de croissance et phase stationnaire n'est pas toujours claire.

La matière sèche (biomasse) continue en effet à augmenter, significativement en phase stationnaire même si cela se produit à un taux plus faible .ceci s'explique par le faite que la masse de la cellule consiste en la masse des macromolécules nécessaires à sa réplication, mais également en matière de réserves.

Parallèlement, nous remarquons un abaissement du pH du milieu qui correspond à la première phase de croissance bactérienne pour les 4 souches (**figure IV.15**).

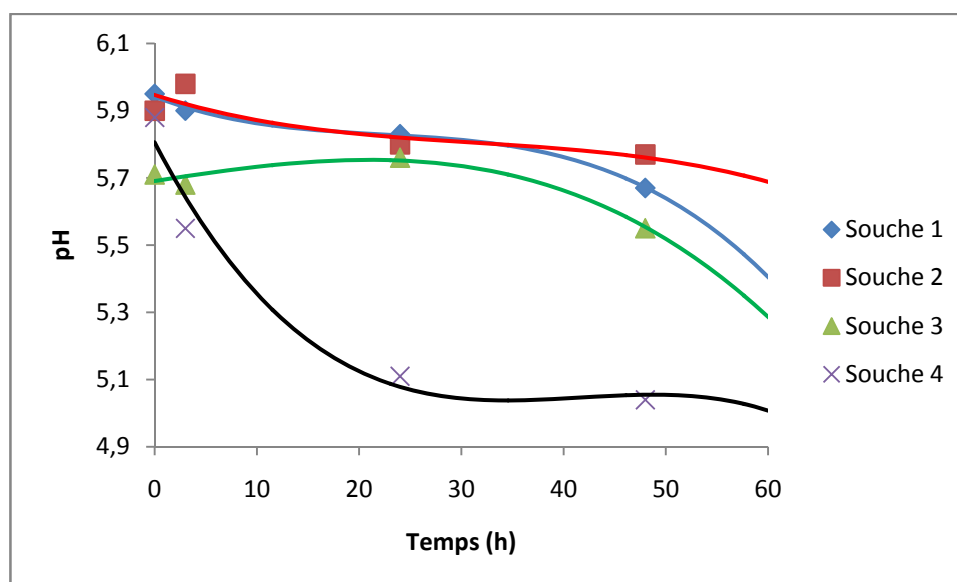


Figure IV.15: Variation du pH au cours de la biodégradation du méthyle orange par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

Donc il apparait nettement que la biodégradation du MO par la souche 4 isolée a permis d'attendre des efficacités supérieures à 90%.

IV.2.2. Cinétique de la biodégradation du rouge Congo par les souches bactériennes

Les tableaux de l'**annexe B** traduisent les résultats de la biodégradation du colorant rouge et de l'évolution de la croissance bactérienne ces résultats permettant la représentation de la figure.

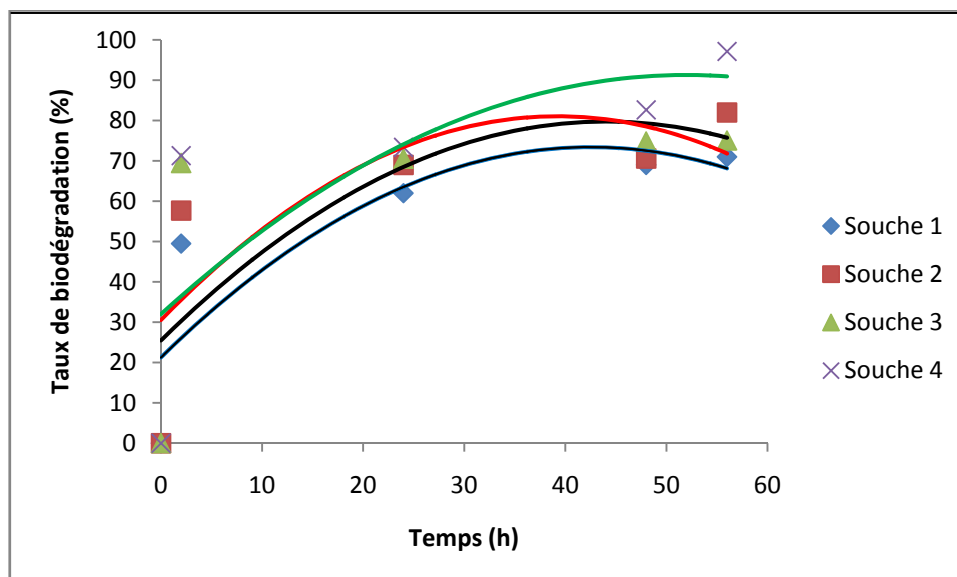


Figure IV.16: Variation du taux de biodégradation du colorant rouge par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

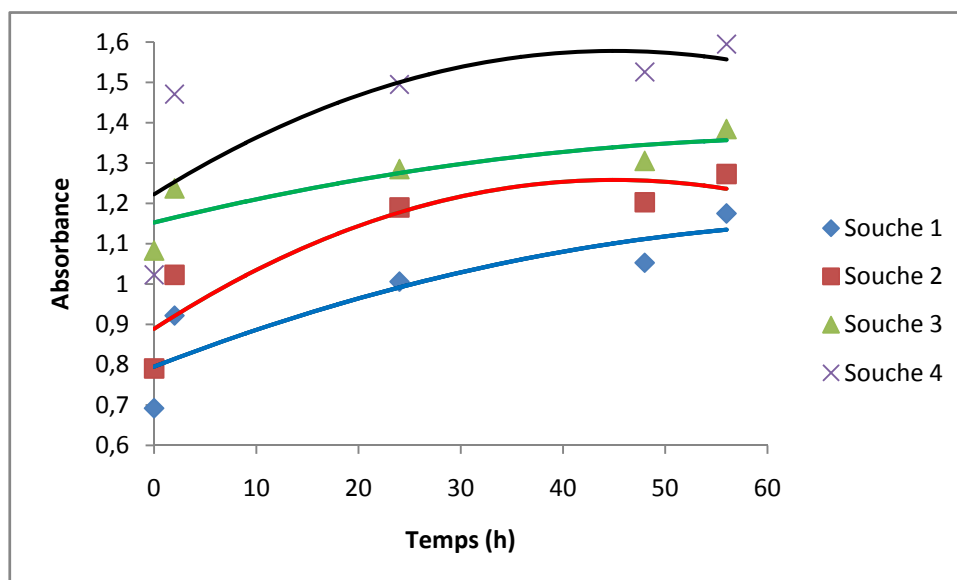


Figure IV.17: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

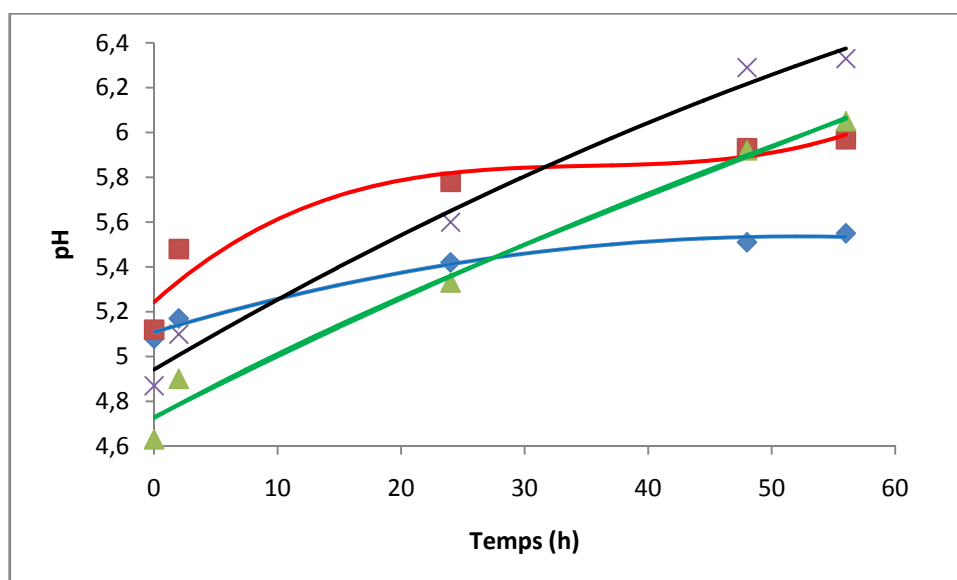


Figure IV.18: Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant rouge par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

Les figures IV.16, IV.17 et IV.18 illustrent les taux de biodégradation de rouge ainsi que la croissance bactérienne et la variation du pH au cours de la dégradation en fonction de temps pour les 4 souches. Donc après 48h d'incubation sans l'addition du colorant rouge nous avons observé une acidification rapide du milieu durant les premières heures de croissance avec une augmentation de l'opacité du milieu on explique cela par la multiplication des microorganismes cette phase correspond à la phase de latence ou les bactéries inoculées dans le milieu s'adaptent à leurs environnement.

Après 2h d'incubation avec l'addition du colorant rouge nous remarquons une croissance bactérienne rapide avec un taux de dégradation qui atteint 49%, 5%, 57%, 68%, 69%, 45%, et 73.36% respectivement, elle correspond à la phase d'accélération cela est dû à l'puisement des éléments nutritifs.

Par ailleurs, il est connu que la flore microbienne a besoin d'éléments minéraux pour sa croissance, en particulier d'azote, dont les proportions optimales, généralement admises, sont de 10g d'azote et 1g de phosphore pour 100 g de carbone. Ces éléments rentrent dans l'édification des constituants cellulaires lors de la multiplication des microorganismes (synthèse d'ADN, protéines...ect.). Donc la présence de colorant rouge va influencer sur la croissance des souches.

Après 5 jours d'incubation le taux de croissance atteint son maximum et reste constant cela est dû à l'accumulation des déchets métaboliques dans le milieu de culture et à la disparition des éléments nutritifs, cette phase correspond à la phase exponentielle [62].

La croissance en phase exponentielle s'accompagne d'une acidification du milieu qui est marquée pour les 4 souches.

Nous observons que le meilleur taux de biodégradation du colorant rouge est par la 4eme souche 97.13% après 48h. Les souches 1,2 et 3 atteint après 48h est de 69%, 70,60% et 74.82% puis augmente lentement et reste constant.

On peut donc supposer que l'absence de l'activité biodégradable de la souche *Escherichia coli* due à l'accumulation de déchets métaboliques dans le milieu de culture et à la disparition d'un ou de plusieurs composés nécessaires à la croissance bactérienne ; les microorganismes sont très sensibles à des conditions défavorables pendant cette phase

IV.2.3. Cinétique de la biodégradation du colorant bleu par les souches bactériennes

A fin de vérifier s'il y a eu croissance de la population ainsi que le pH du milieu ont été mesurés avant centrifugation

Les tableaux des résultats du graphe sont regroupés en **annexe B** tableau et

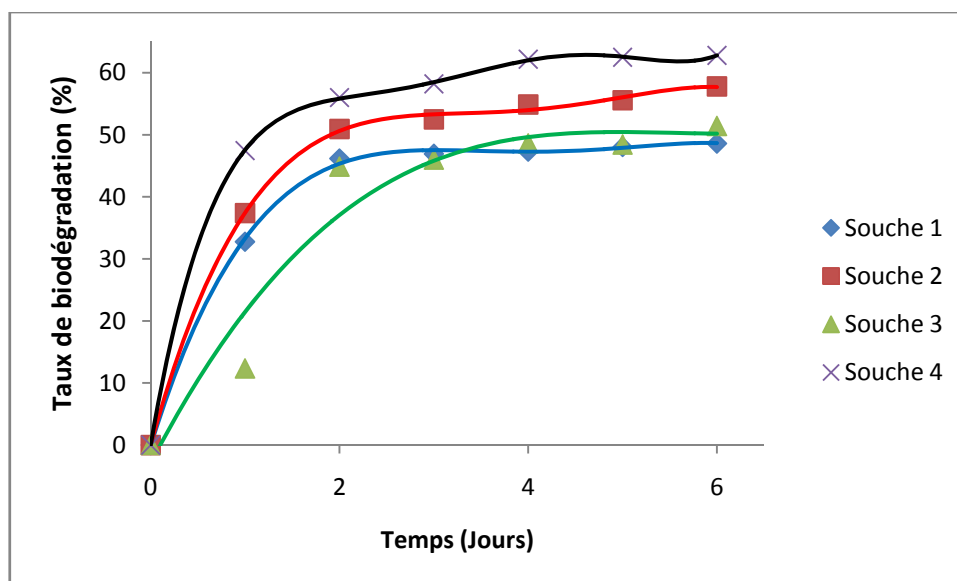


Figure IV.19: Variation du taux de biodégradation du colorant bleu par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

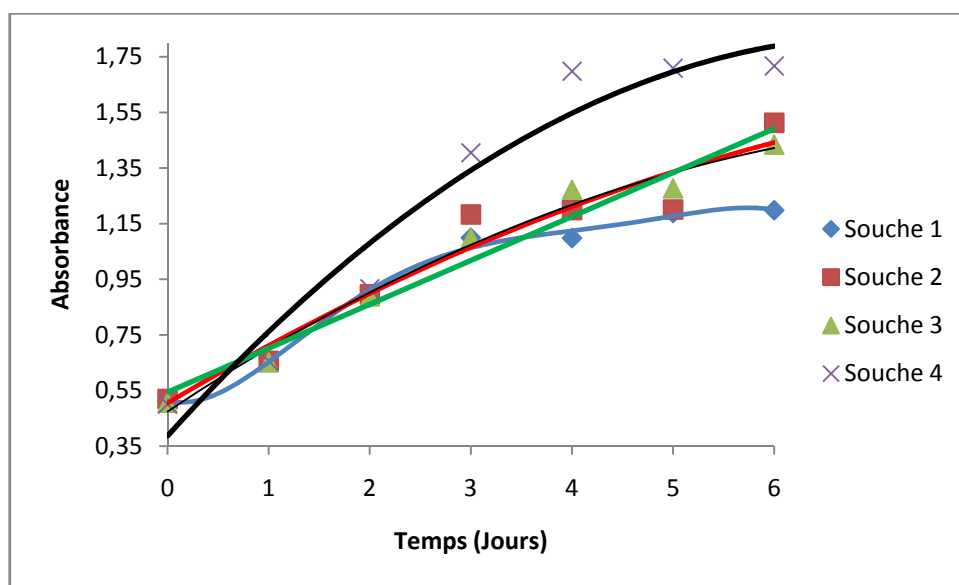


Figure IV.20: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant bleu par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

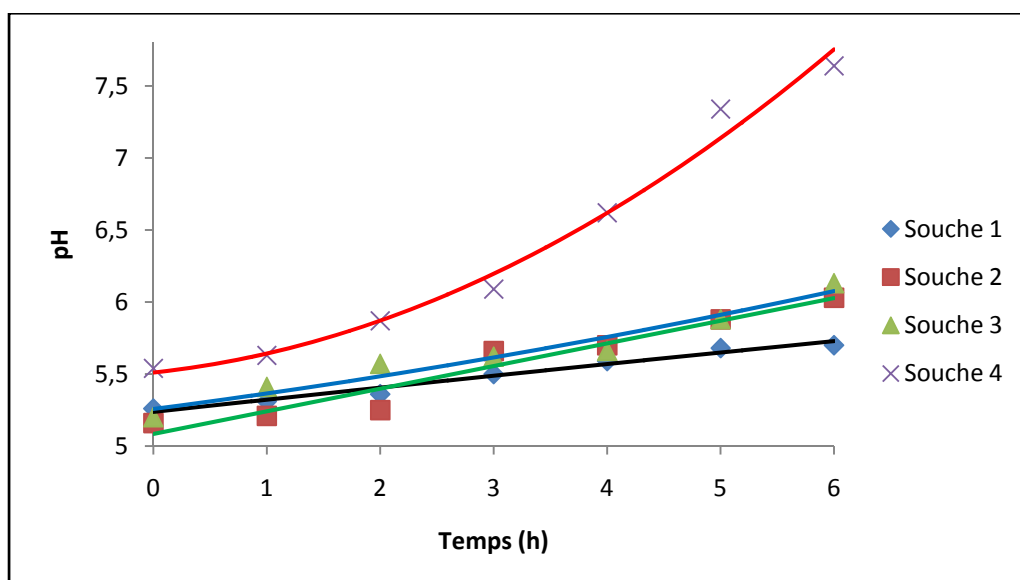


Figure IV.21: Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant bleu par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

Les **figures IV.19, IV.20 et IV.21** illustrent les variations de la croissance bactérienne, le pH et le taux de la biodégradation du colorant bleu cibacete en fonction du temps pour les quatre souches.

La présence de colorant bleu dès le début de l'incubation va influencer la croissance des 4 souches. Au début des 48 heures le taux de biodégradation ont augmenté, le taux a été mesuré entre 46% et 56%, on constate cependant nettement sur la figure que ces taux augmentent progressivement à la phase d'accélération pour les quatre souches.

Après 4 jours d'incubation le taux de croissance atteint son maximum et reste constant la production de biomasse plus forte chez S4. Parallèlement, nous remarquons un abaissement du pH du milieu qui correspond à la première phase de croissance bactérienne est plus marquée chez les souches 1.2.3 avec un pH égal à 4.99, 5.70 et 5.66 respectivement.

Pour la souche 4 il augmente progressivement pour se rapprocher de la neutralité en fin de culture avec un pH égal à 7,64 correspondant à l'accumulation des sous produits du colorant utilisé dans la solution. En effet, les produits de biodégradation du bleu cibacete sont de caractère basique.

Notre test de la biodégradabilité nous a permis de constater que le colorant bleu est très peu biodégradable dans ces conditions d'expérimentation. A titre de comparaison, un rouge Sirius et méthyle orange sont dégradés à plus de 90%. Cela est dû probablement à la nature de bleu cibacete, En effet, la perméabilité cellulaire aux colorants dépend fortement de leur structure chimique et des ramifications qu'ils peuvent porter.

IV.3. Effet de l'adaptation des bactéries aux colorants sur la cinétique de la biodégradation

La souche 4 a été sélectionnée la meilleure souche qui a donné un taux maximal de biodégradation des colorants, une mesure de l'absorbance et de croissance bactérienne au même milieu et Après la biodégradation des colorants ainsi que les mêmes conditions initiales de travailler à une concentration de 40 mg/l pour tous les colorants et à la température 37°C.

Et cela pour déterminer l'effet de l'adaptation des bactéries aux colorants sur la cinétique de la biodégradation

IV.3.1. Cinétiques de biodégradation du MO par des bactéries non adaptées et adaptées

Le **tableau A.1** en **Annexe B**, rassemble les résultats des cinétiques de biodégradation du MO par des bactéries non adaptées et adaptées.

Les **figures IV.22, IV.23 et IV.24** illustrent la variation du taux de biodégradation, le pH et la densité optique au cours de la biodégradation du méthyle orange par la S4 en fonction du temps.

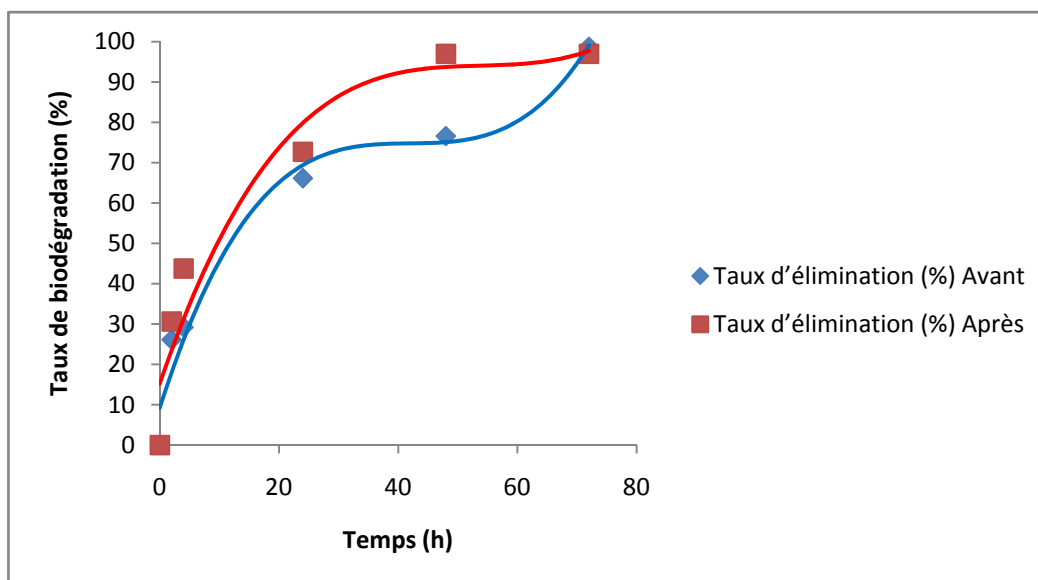


Figure IV.22: Variation du taux de biodégradation du méthyle orange par la S4 en fonction du temps.

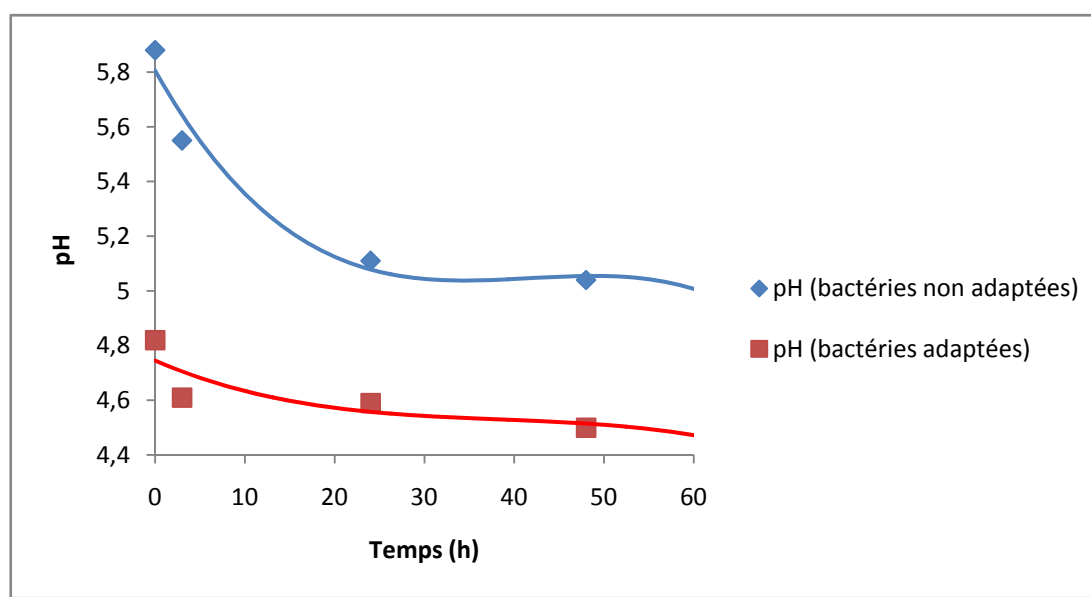


Figure IV.23: Variation du pH au cours de la biodégradation du méthyle orange par la S4 en fonction du temps

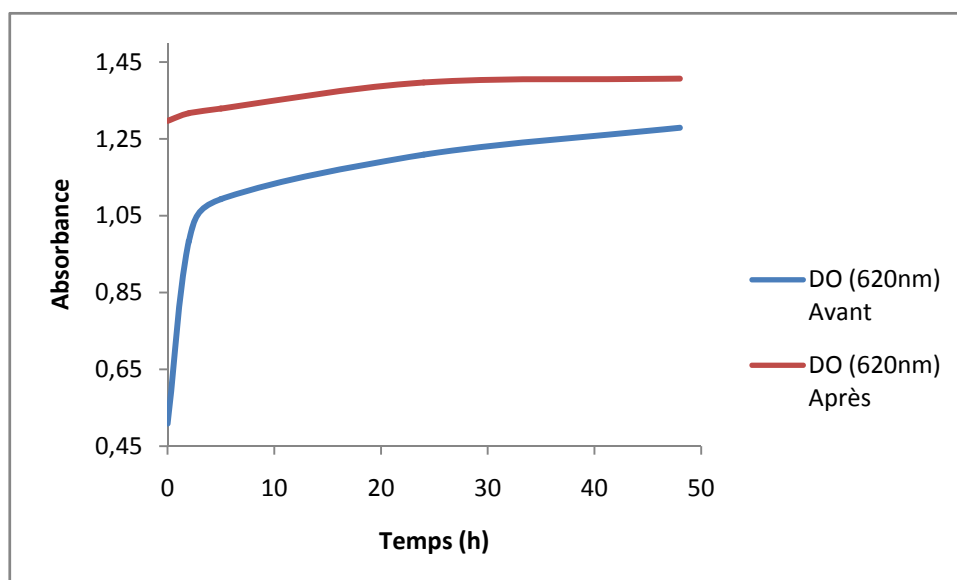


Figure IV.24: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du méthyle orange par la S4 en fonction du temps

IV.3.2. Cinétiques de biodégradation du colorant rouge Congo par des bactéries non adaptées et adaptées

Les figures IV.25, IV.26 et IV.27 illustrent la variation du taux de biodégradation, le pH et la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge par la S4 en fonction du temps.

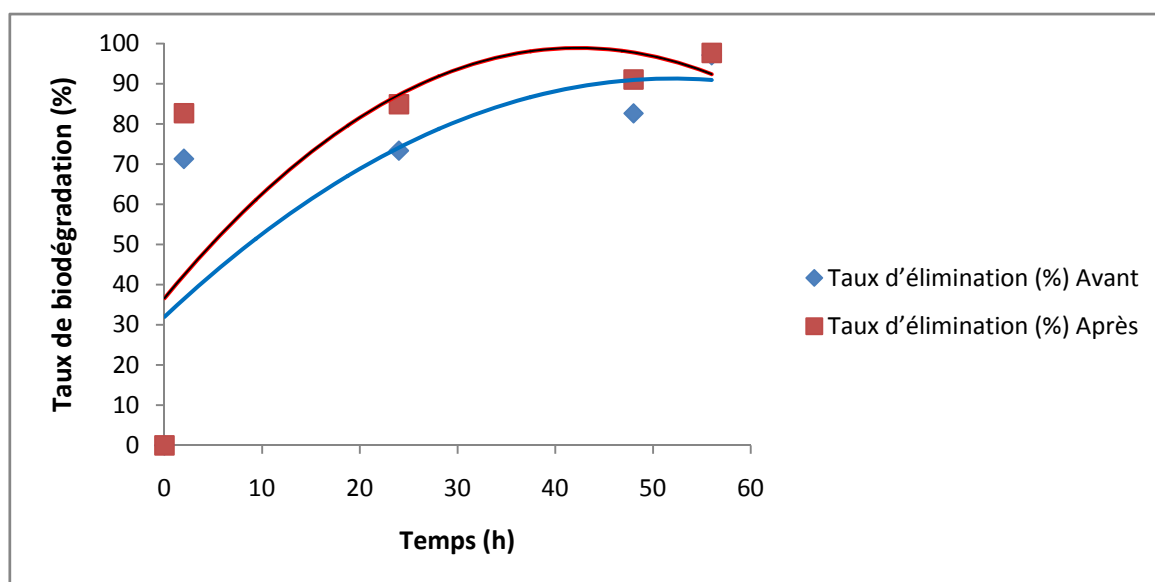


Figure IV.25: Variation du taux de biodégradation du colorant rouge par la S4 en fonction du temps

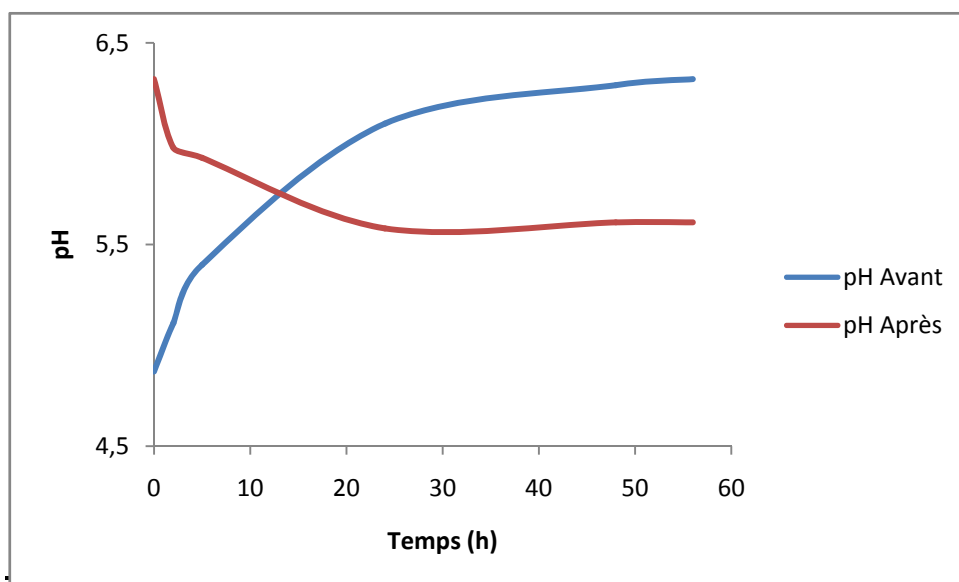


Figure IV.26: Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant rouge par S4 en fonction du temps

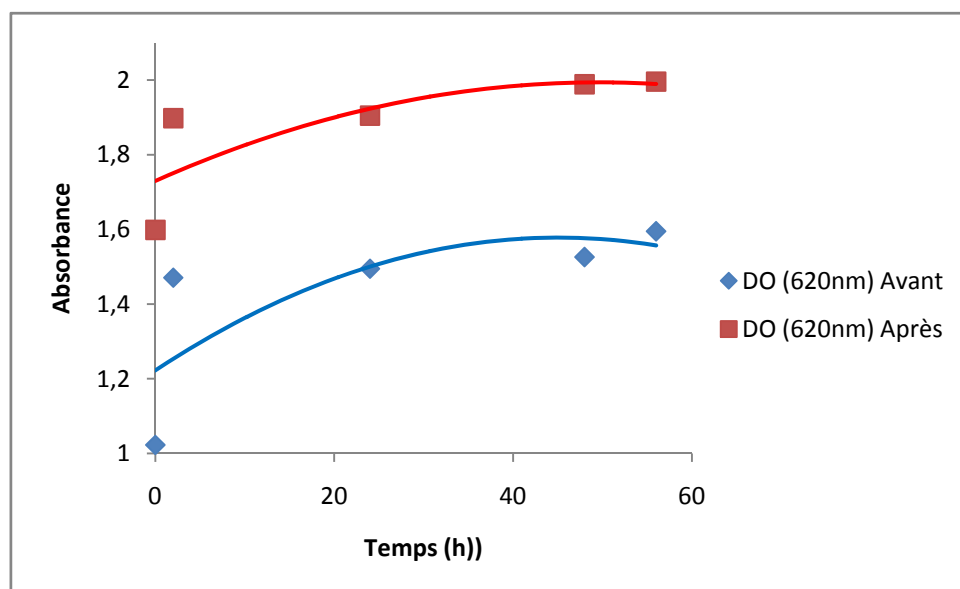


Figure IV.27: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge congo par la S4 en fonction du temps

IV.3.3. Cinétiques de biodégradation du colorant bleu par des bactéries non adaptées et adaptées:

Les figures IV.28, IV.29 et IV.30 illustrent la variation du taux de biodégradation, le pH et la densité optique au cours de la biodégradation du colorant bleu par la S4 en fonction du temps.

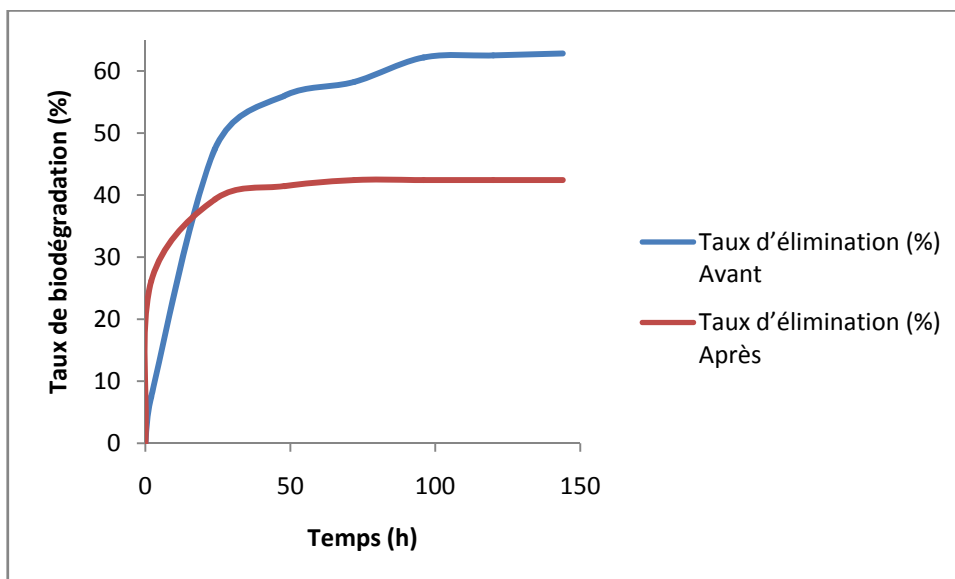


Figure IV.28: Variation du taux de biodégradation du colorant bleu par la S4 en fonction du temps

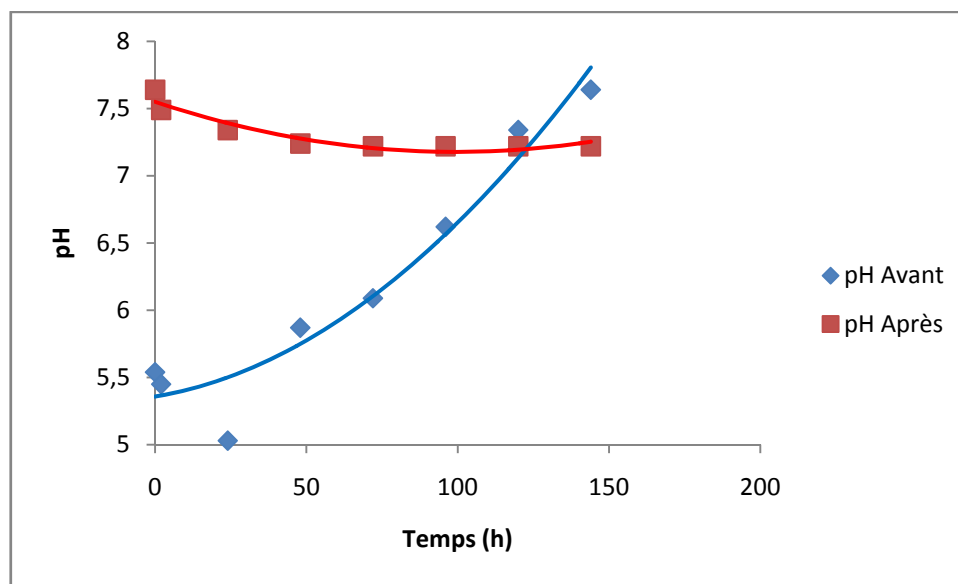


Figure IV.29: Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant bleu par S4 en fonction du temps

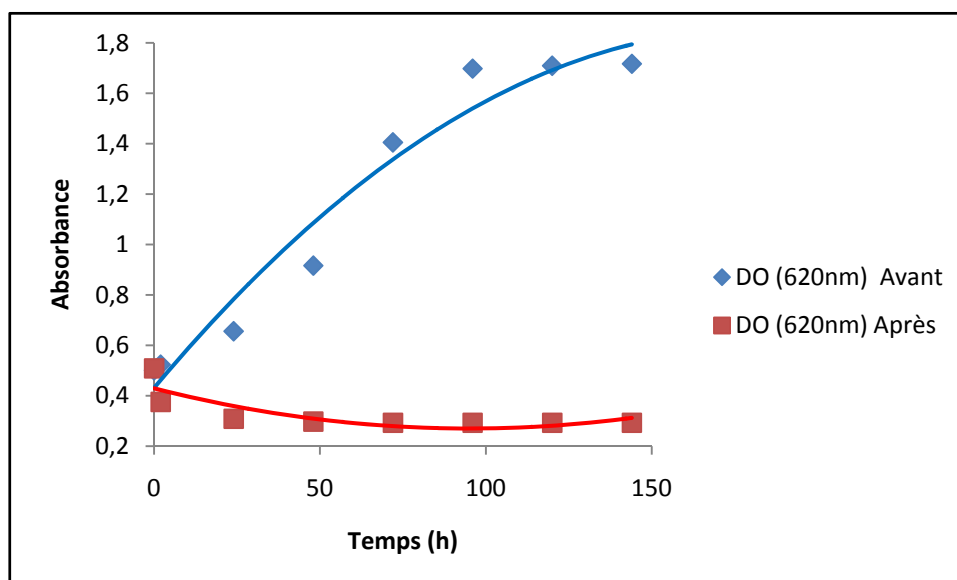


Figure IV.30: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant bleu par la S4 en fonction du temps

Les figures IV.22 à IV.30 représentent le profil de biodégradation de 40 mg/l des colorants au cours du temps par la souche 4 adaptée à la même concentration des colorants. La cinétique de biodégradation est plus rapide, et le phénomène de biodégradation se déclenche immédiatement après la mise en milieu les colorants, contrairement aux souches non adaptée.

La souche 4 est capable de croître en présence des colorants sans ajout des nutriments

A partir du 2h on assiste à une augmentation du pH. Il passe de 4,8 à 5,2 de 4,7 à 5,8 et de 7,3 à 7,6 en présence de MO, rouge et bleu respectivement. Ceci est dû probablement à l'activité microbienne par une dégradation des protéines en libérant les ions NH_4 (Patureau, 1995) car la réaction biologique est consommatrice de protons.

IV.4. Effet de l'Acidité initiale du milieu sur la cinétique de la biodégradation

Les figures IV.31, IV.32 et IV.33 illustrent la variation du taux de biodégradation, le pH et la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge Congo par la S4 en fonction du temps en milieu acide.

La biodégradation du colorant croît parallèlement avec l'acidification du milieu dans l'intervalle (4,5-5,5), la nécessité de voir l'effet de l'acidité initiale (5,4g/50ml de sodium acétate $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, 2,4g /100 ml de glacial acétique acide : pH= 4,6) du milieu sur la cinétique de la biodégradation a suscité notre intérêt pour utiliser un milieu suffisamment

tamponné, qui pourra éventuellement augmenter le rendement de la biodégradation avec un temps d'élimination différent.

Les figures IV.31, IV.32 et IV.33 montrent que la souche 4 isolée est active vis-à-vis du colorant rouge Congo à pH 4.7, on constate cependant nettement que le taux de biodégradation augmente progressivement entre 2h et 24h qui montre une rapide élimination du colorant rouge, ceci indique que ce colorant est très bien éliminé dans des conditions où le pH du milieu est acide en effet la quantité de la biomasse produite a été observée, ceci s'explique par la capacité de la souche à métaboliser et éliminer le colorant utilisé.

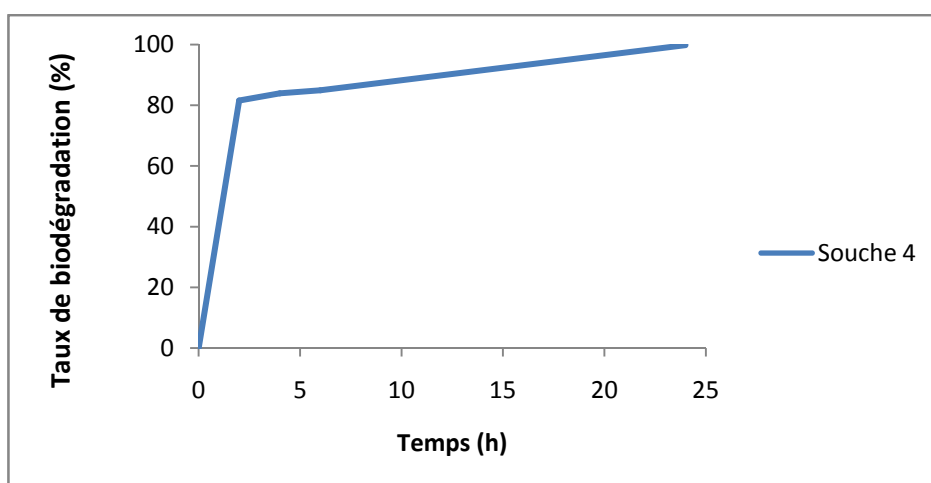


Figure IV.31: Variation du taux de biodégradation du colorant rouge Congo par la S4 en fonction du temps en milieu acide

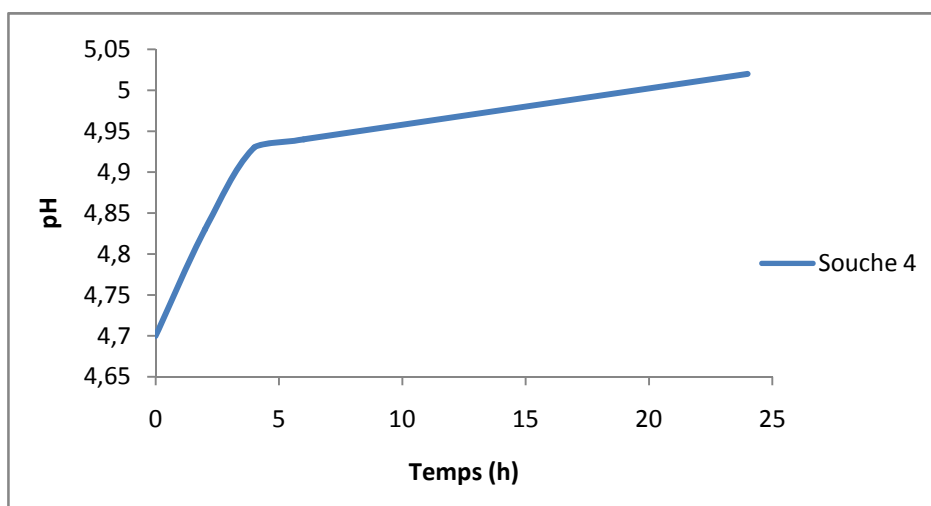


Figure IV.32: Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant rouge Congo par S4 en fonction du temps en milieu acide

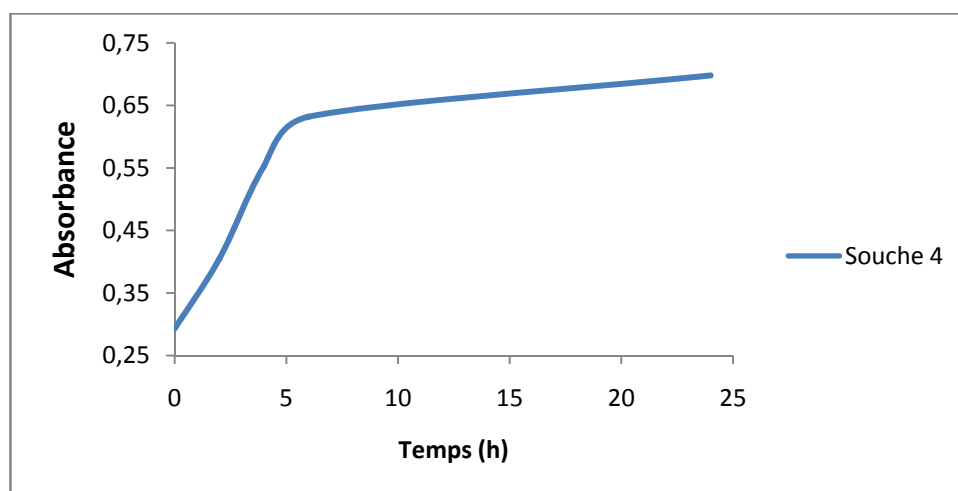


Figure IV.33: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge Congo par la S4 en fonction du temps en milieu acide

IV.5. Analyse par chromatographie liquide à haute performance

Les résultats de biodégradation des colorants ont été confirmés par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), mais malheureusement, on n'a pas pu suivre la biodégradation des colorants durant tout le temps car le chromatographe n'était pas à notre disposition.

IV.5.1. Chromatogramme (HPLC) du MO avant et après la biodégradation

La **figure IV.34** montre le pic du MO élué à 8,60 min avant le début de la dégradation. La disparition totale du colorant MO a été confirmée par HPLC, Le Chromatogramme représentés sur la **figure IV.35**, montre qu'aucun métabolite observant après la dégradation.

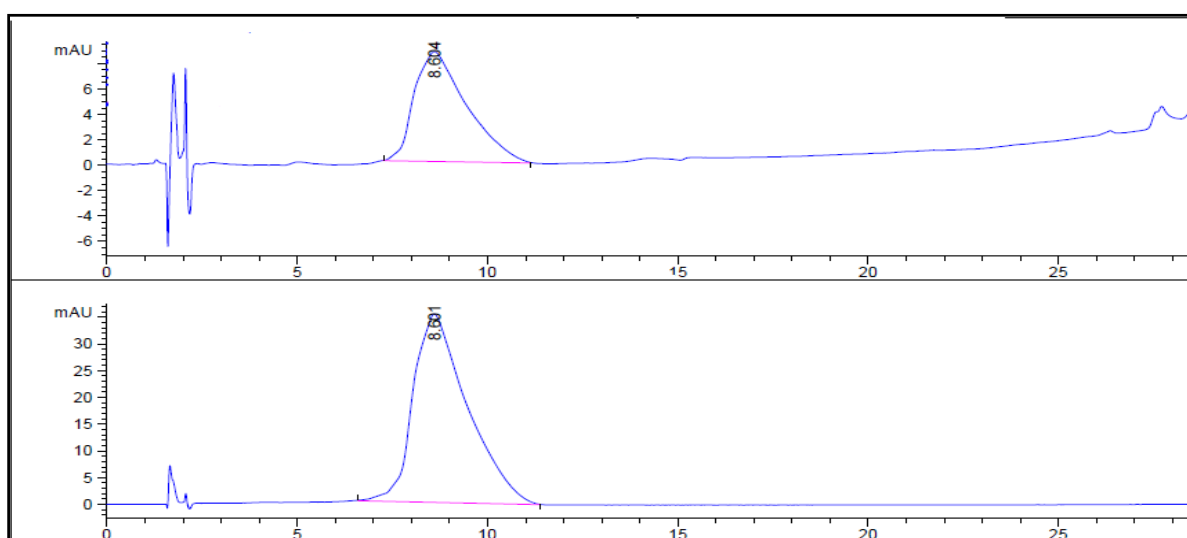


Figure IV.34: Chromatogramme (HPLC) standard du MO.

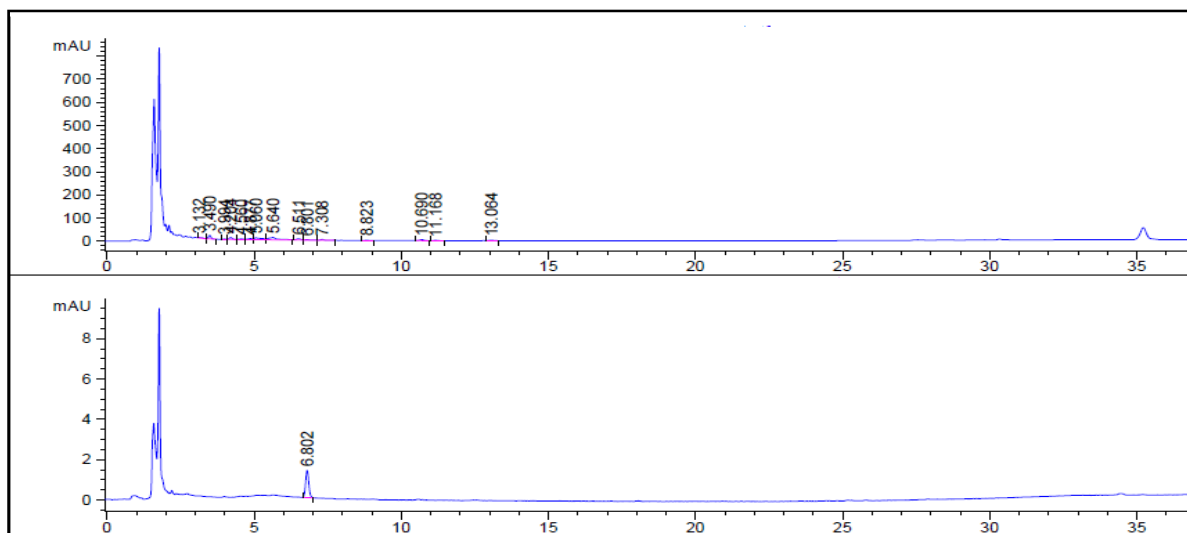


Figure IV.35: Chromatogramme du MO après la biodégradation.

IV.5.2. Chromatogramme (HPLC) du colorant Rouge Congo avant et après la biodégradation

La **figure IV.36** montre le chromatogramme standard du colorant Rouge Congo, avec un temps de rétention de 8,24 min.

Le Chromatogramme en HPLC représentés sur la **figure IV.37**, montre qu’aucune nouvelle apparition de pics d’absorption n’a été constatée, ce qui confirme la biodégradation du colorant.

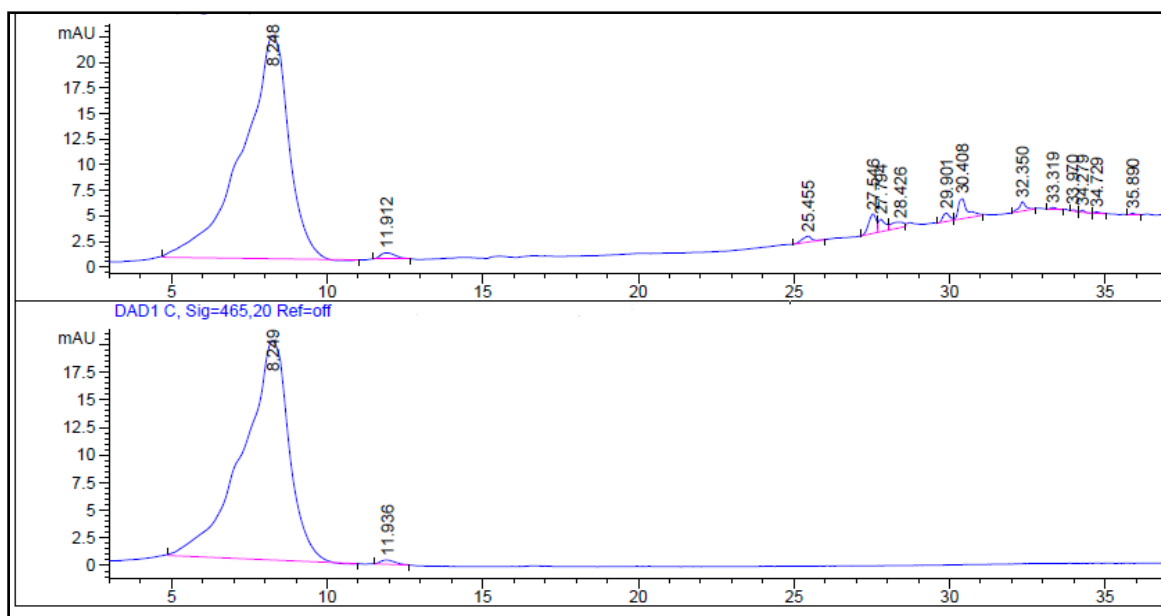


Figure IV.36: Chromatogramme (HPLC) standard du colorant Rouge Congo avant la biodégradation.

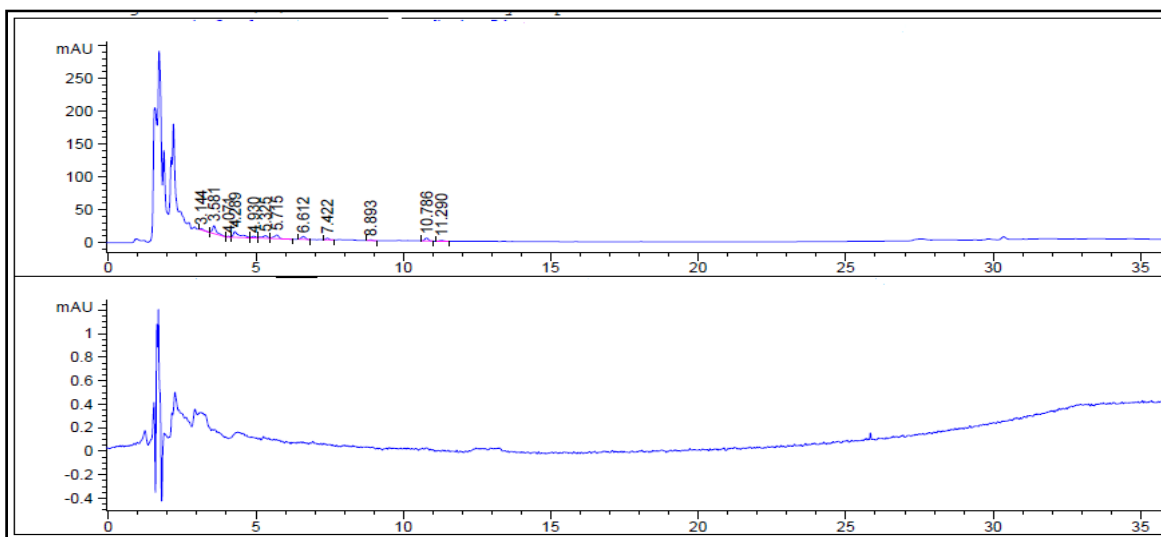


Figure IV.37: Chromatogramme (HPLC) du colorant rouge Congo après la biodégradation.

IV.5.3. Chromatogramme (HPLC) du colorant Bleu Cibacete avant et après la biodégradation

La **figure IV.38** montre le pic du colorant Bleu Cibacete élué à un temps de 6.9mn ne contient pas d'impureté visible sur le Chromatogramme (HPLC) malgré que le produit utiliser est composé à application industrielle, et la biodégradation du bleu Cibacete par la souche 4 a été confirmée par HPLC

Le Chromatogramme illustré dans la **figure IV.39** montre la disparition totale de pic de bleu Cibacete, la coloration bleu persiste exprimé par UV-Visible est relative au métabolite visible sur le chromatogramme.

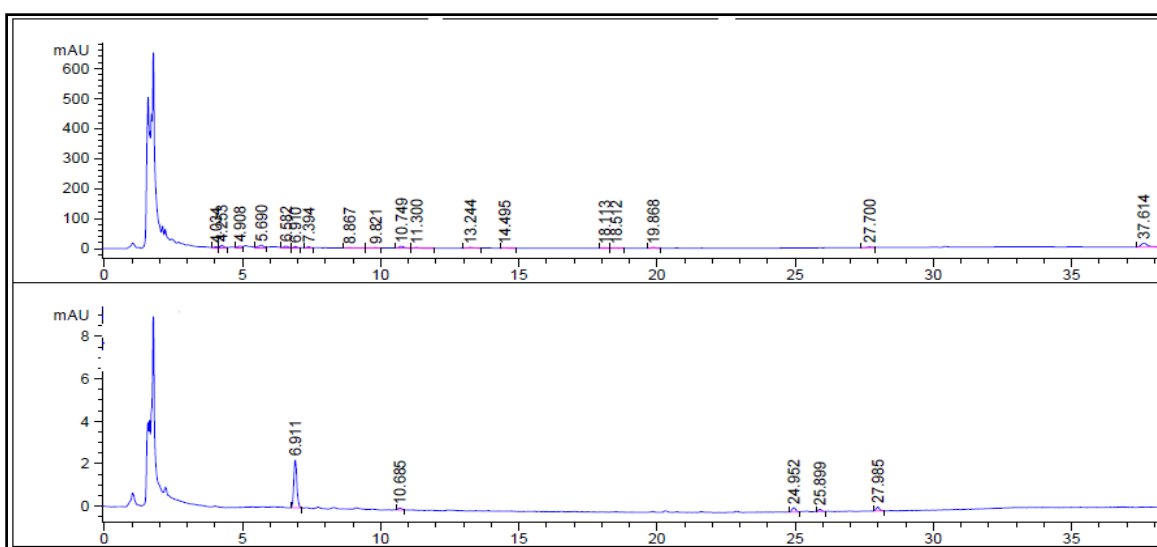


Figure IV.38: Chromatogramme (HPLC) standard du colorant Bleu Cibacete avant la biodégradation.

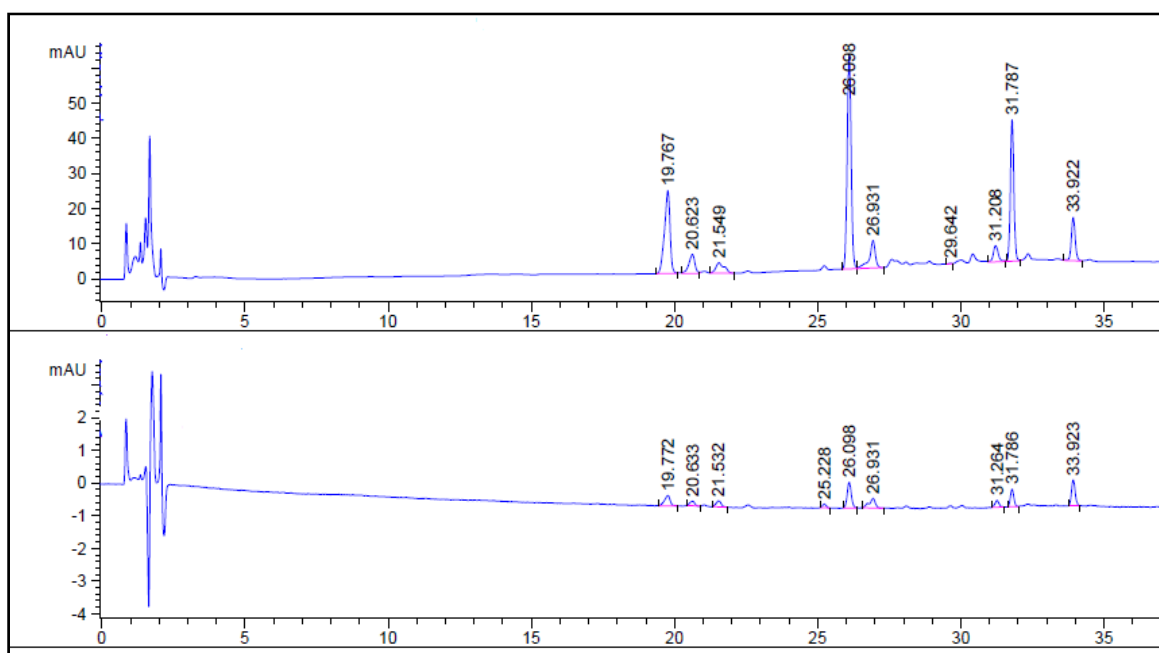


Figure IV.39: Chromatogramme (HPLC) du colorant Bleu Cibacete après la biodégradation

IV.6. Analyse par Chromatographie Ionique

Sur les chromatogrammes (CI) représentés sur les **figures IV.40 à IV.51**, on remarque que la somme des concentrations en ions et cations est très inférieure à la concentration initiale avant la biodégradation (à $t=0$) ce qui prouve que nous avons une biodégradation des colorants étudiés.

IV.6.1. Chromatogramme (CI) du colorant Bleu Cibacete avant et après la biodégradation

Les spectres obtenus concernant la chromatographie ionique du colorant Bleu Cibacete sont identiques avant et après biodégradation pour les anions (**figures IV.40 et IV.41**) et les cations (**figures IV.42 et IV.43**). Seulement les quantités de Mg^{2+} et Ca^{2+} présente dans le colorant commercial ont disparu après biodégradation.

Bleu Cibacete (Bleu Dispers 3) : $\lambda_{max}=630$ nm

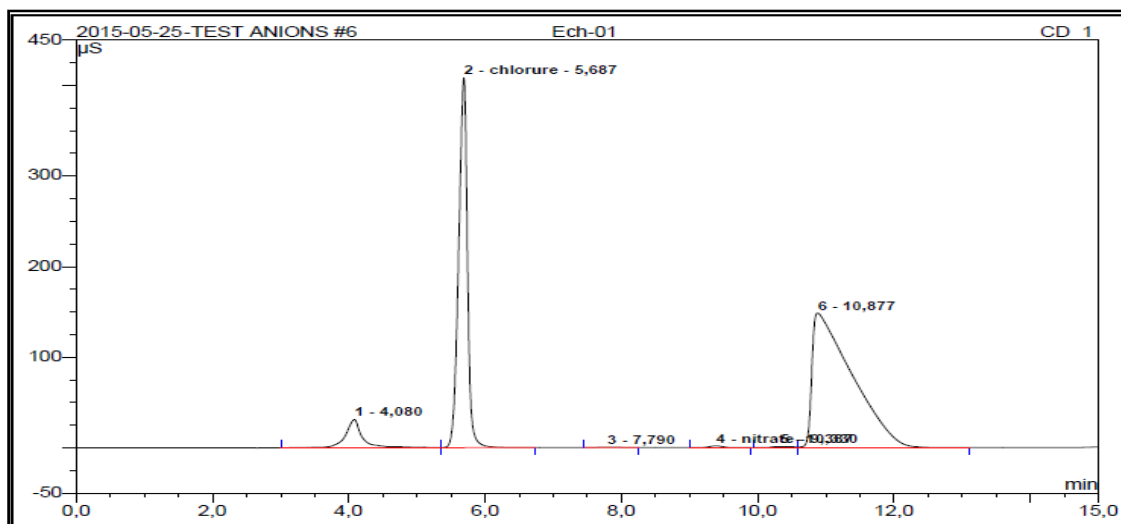


Figure IV.40: Chromatogramme standard du bleu Cibacette pour la détermination des anions

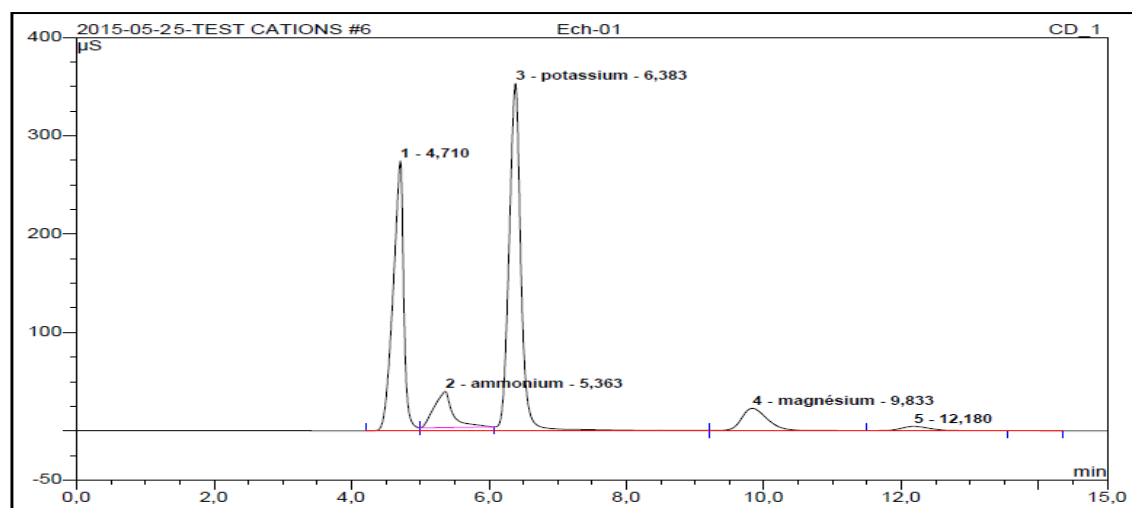


Figure IV.41: Chromatogramme standard du bleu Cibacette pour la détermination des cations

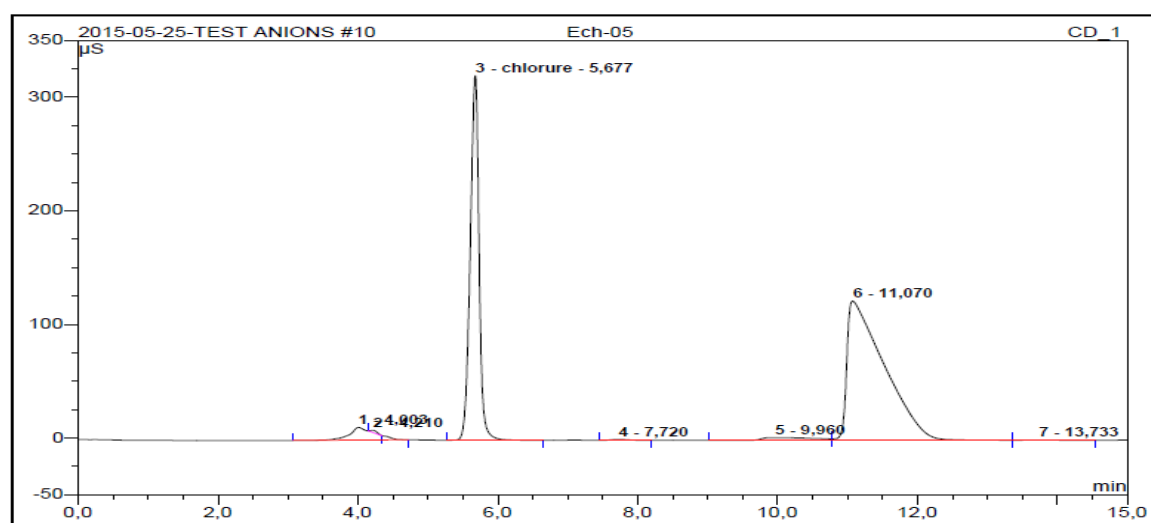


Figure IV.42: Chromatogramme après la biodégradation du bleu Cibacette pour la détermination des anions

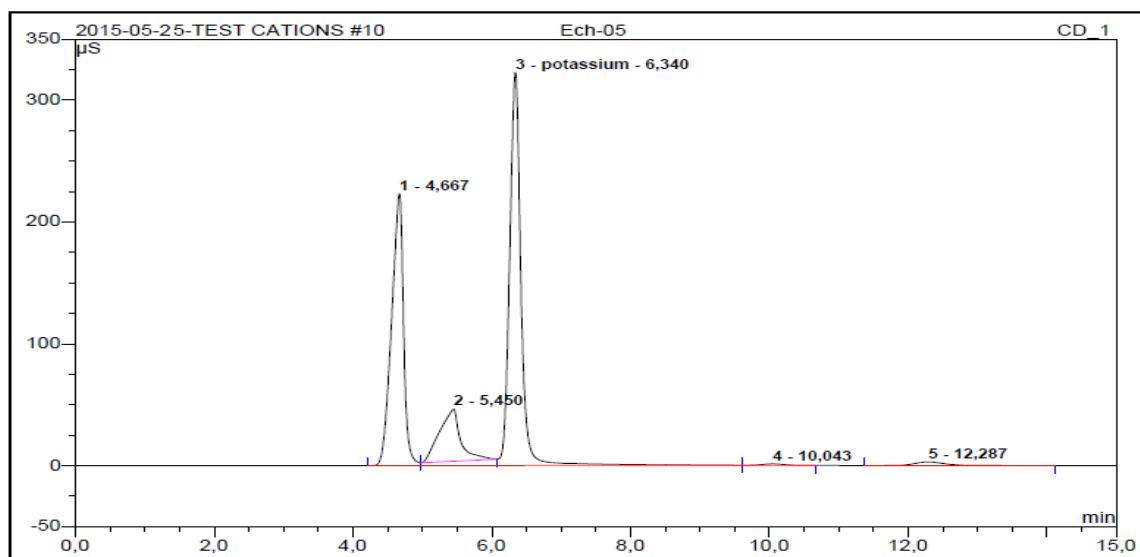


Figure IV.43: Chromatogramme après la biodégradation du bleu Cibacette pour la détermination des anions

IV.6.2. Chromatogramme (CI) du colorant rouge Congo avant et après la biodégradation

Le chromatogramme ionique du rouge congo pour les anions (**figures IV.44 et IV.45**) et les cations (**IV.46 et IV.47**) sont en accord avec la structure du colorant composé du cation sodium et des anions chlorures et sulfates.

Les figures obtenues par chromatographie ioniques pour la solution du rouge congo avant et après dégradation montrent le changement qualitatif et quantitatif des cations et des anions provoqué par l'oxydation du colorant et par conséquent celle des cations. Le chromatogramme des cations fait la présence d'une grande quantité de cation NH_4^+ , absent avant dégradation, et issue de l'oxydation des groupes amines du colorant.

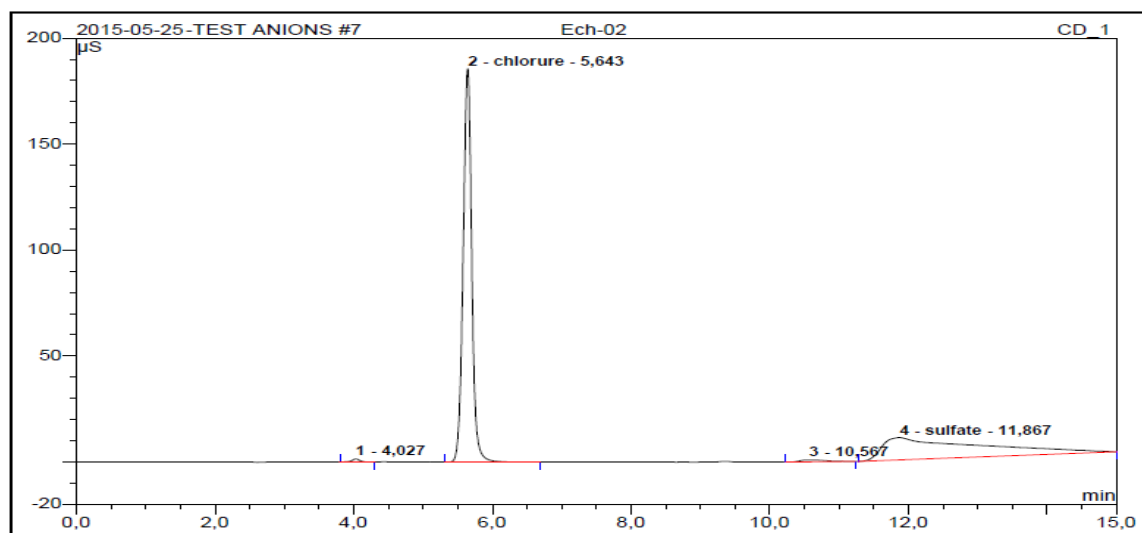


Figure IV.44: Chromatogramme standard colorant rouge pour la détermination des anions

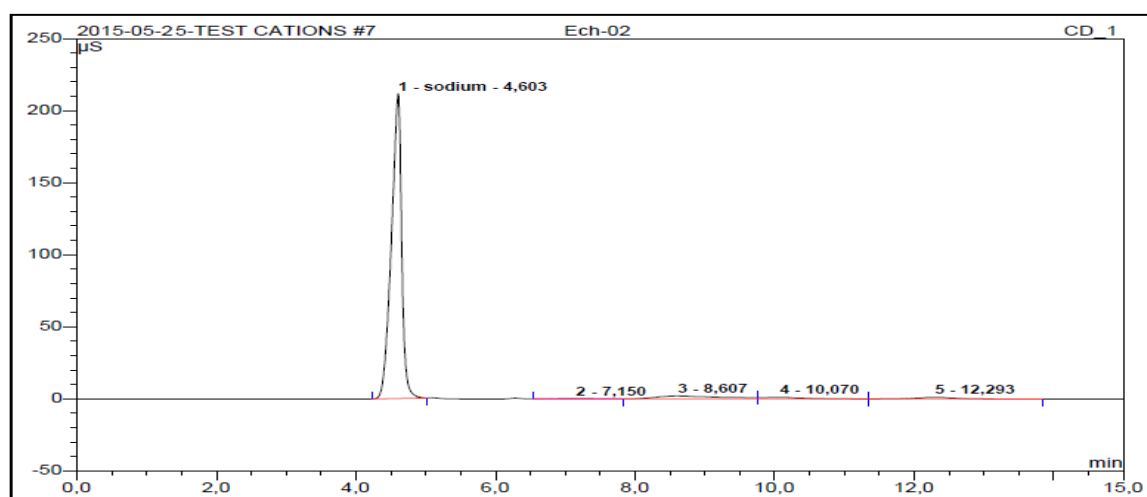


Figure IV.45: Chromatogramme standard colorant rouge pour la détermination des cations

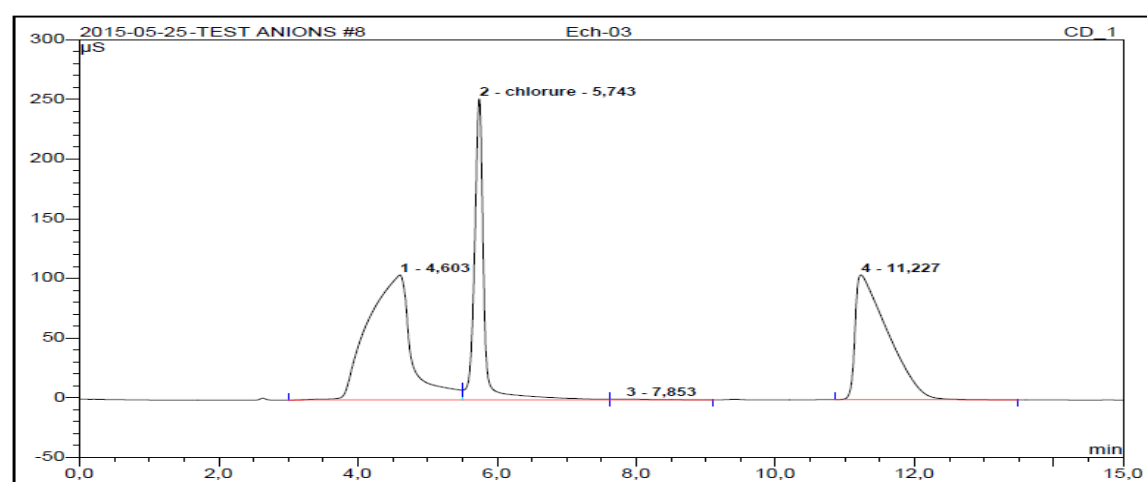


Figure IV.46: Chromatogramme après la biodégradation du colorant rouge Congo pour la détermination des anions

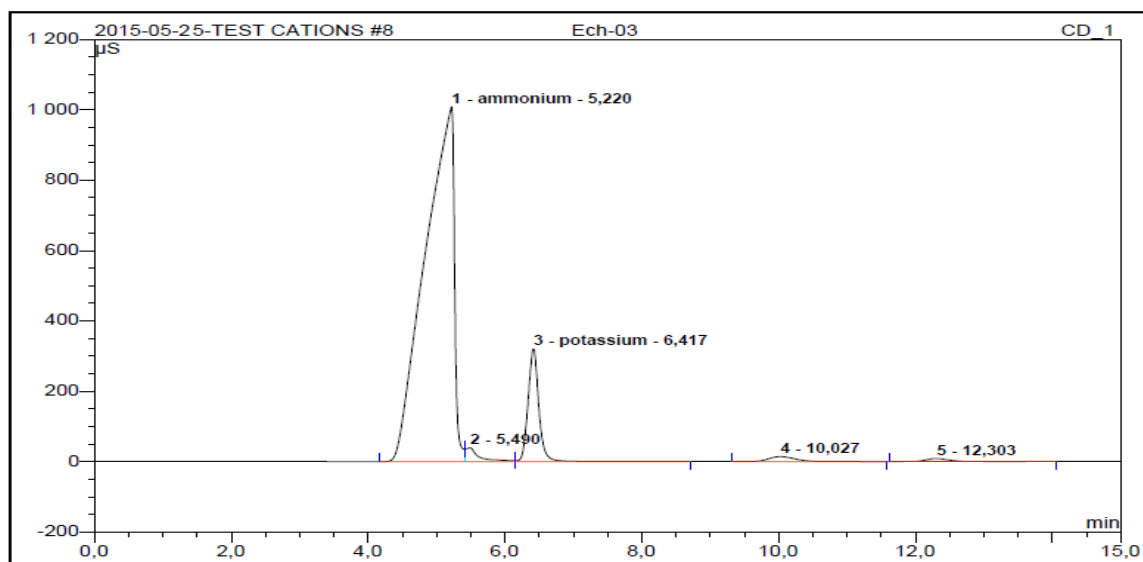


Figure IV.47: Chromatogramme (CI) après la biodégradation du colorant rouge Congo pour la détermination des cations

IV.6.3. Chromatogramme (CI) du MO avant et après la biodégradation

Les chromatogrammes ioniques des cations (**figures IV.48 et IV.49**) et des anions (**figures IV.50 et IV.51**) reflètent exactement la structure chimique et la composition du méthylorange avant biodégradation. Ceux des anions et des cations enregistrés après dégradation montrent l'activité bactérienne vis-à-vis du colorant.

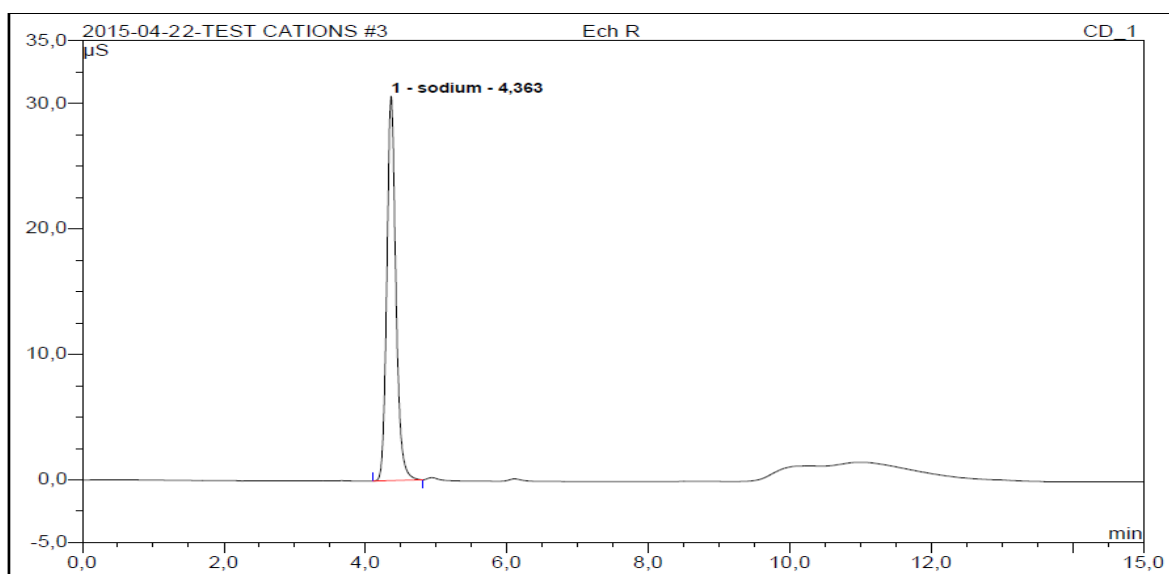


Figure IV.48: Chromatogramme (CI) standard du MO pour la détermination des cations

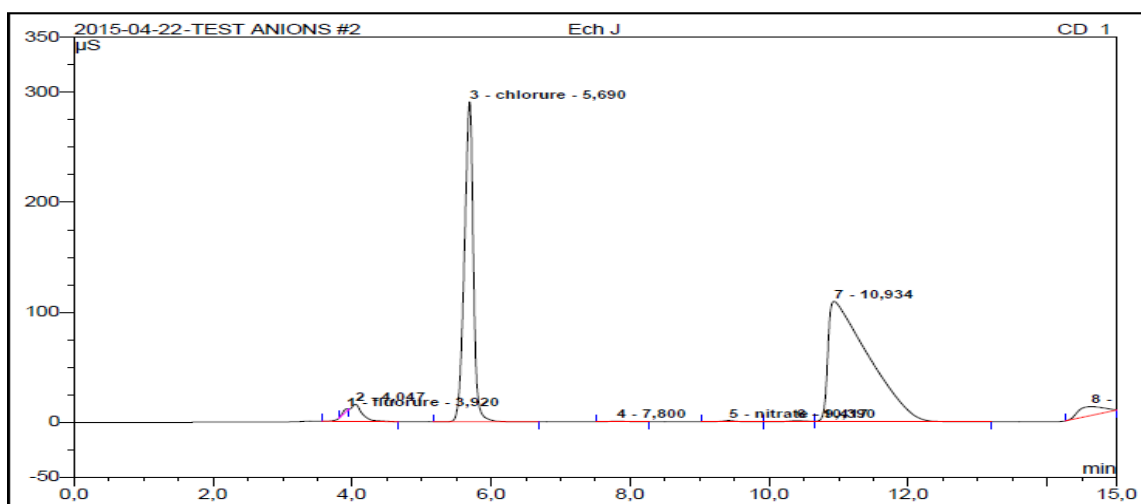


Figure IV.49: Chromatogramme standard du MO pour la détermination des anions

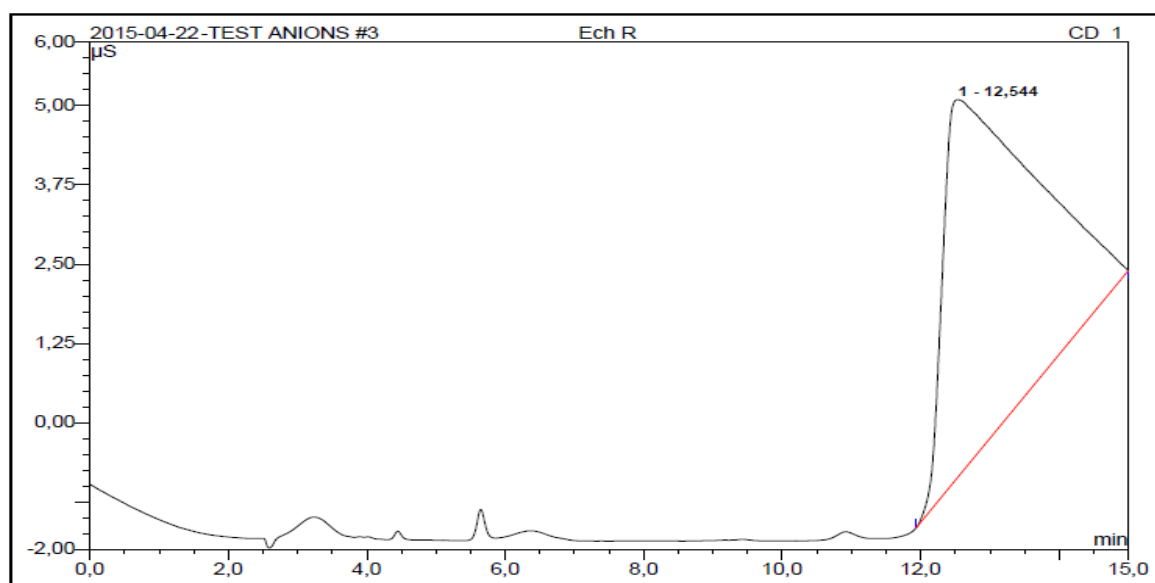


Figure IV.50: Chromatogramme après la biodégradation du MO pour la détermination des anions

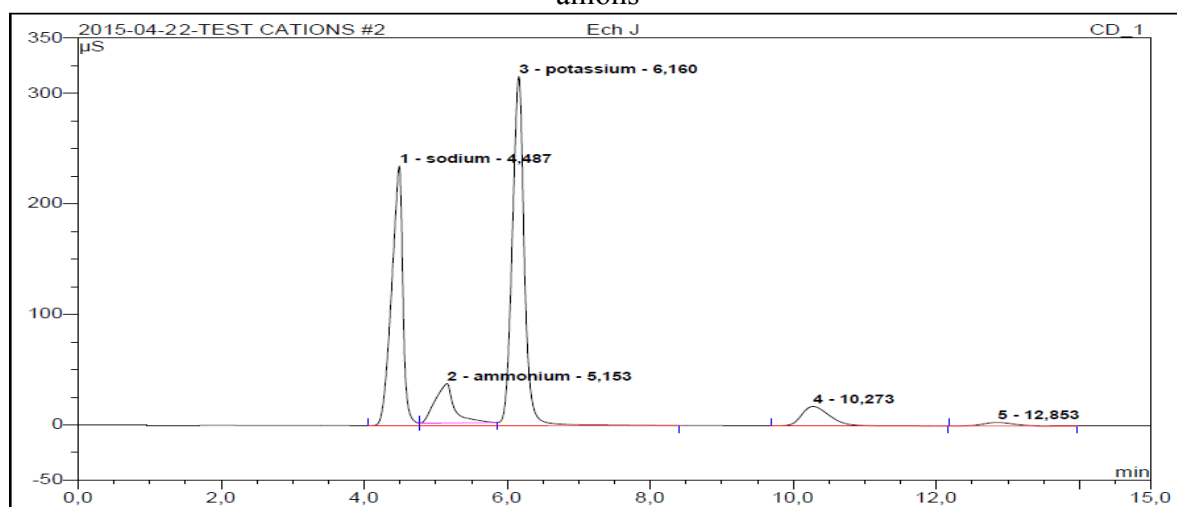


Figure IV.51: Chromatogramme après la biodégradation MO pour la détermination des cations

CONCLUSION GENERALE

La pollution des eaux par les colorants présente l'un des problèmes environnementaux majeurs. La haute toxicité justifie les études liées au développement des techniques de traitement, la biodégradation des colorants est une nouvelle technique introduite dans le domaine de la biodépollution des eaux.

Le travail présenté a porté à la fois sur l'étude des cinétiques de croissance des bactéries issues de betterave rouge, et de la biodégradation des colorants synthétiques. Nous avons également étudié l'effet de l'adaptation des bactéries aux colorants sur la cinétique de la biodégradation. Les expériences réalisées ont prouvé que :

- La sélection des bactéries a permis de mettre en évidence la présence de 04 souches bactériennes, parmi lesquelles 03 souches appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae, ce sont des bacilles à gram (-), et une souche est bacille à gram (+).
- La souche d'Enterobacter à gram + (la souche 4) est capable de mieux biodégrader les colorants.
- Des cinétiques de croissance et de biodégradation différentes selon la souche et la composition chimique des molécules. La molécule azoïque de MO et Rouge Congo dans le cas présent se dégrade plus facilement que le colorant Bleu Cibacette.
- La cinétique de croissance commence par une phase de latence suivie d'une phase de croissance exponentielle et se termine par une stagnation après la disparition du colorant.
- La biodégradation de solution colorée en MO et rouge Sirius est plus importante que celle de solution colorée en bleu cibacette, au bout de 60h; avec un taux d'élimination supérieures à 90%.
- La réaction de biodégradation étant consommatrice d'ions H^+ , le pH a tendance à remonter.
- L'adaptation améliore considérablement la cinétique de croissance bactérienne et par conséquent, celle de biodégradation du colorant dans un même milieu enrichie.
- L'acidification initiale du milieu provoque l'absence de la phase de latence ce qui influence la cinétique de croissance bactérienne et celle de la biodégradation.
- L'analyse des résidus de la biodégradation par HPLC et la chromatographie ionique confirme l'efficacité du procédé.

Le travail réalisé montre que des études complémentaires s'avèrent nécessaires pour mieux comprendre certains résultats qui nous permettent d'optimiser les conditions de biodégradation afin de faciliter cette technique de traitement sur le site industriel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] H. Ben Mansour, « Les colorants textiles sources de contamination de l'eau: criblage de la toxicité et des méthodes de traitement », *Revue des sciences de l'eau Journal of Water Science*, vol. 24, n° 3, 2011, p. 209-238.
- [2] Encyclopédie UNIVERSALIS, Les colorants, 2003.
- [3] Seyewet et P.Sisley (1896), chimie des matières colorants artificielles, librairie de l'académie de médecine, Paris Masson, France.
- [4] Cavelier, C., Foussereau, J., Tamb, R., "allergie de contact et colorants (1er partie) cahier de note documentaire de L'INRS 1988, 421-43 p.
- [5] Guivarch E. Traitement des polluants organiques en milieux aqueux par le procédé électrochimique d'oxydation avancée « Electro-Fenton ». Application à la minéralisation des colorants synthétiques, Thèse de doctorat de l'université de Marne-la-Vallée, 2004.
- [6] Little L.W., Chillingworth M.A., in Reports on selected dyes and their effect, Editor :American Dye Manufacturers Institute, 1974, New York,.
- [7] Danish Environmental Protection Agency (2000), survey of azo-colorants in Denmark, toxicity and fate of azo dyes.
- [8] Jung R, D.Steinle et R.Anli Ker (1992), complication of genotoxicity and carcinogenicity of aromatic aminosulfonic. Food chem. Toxicol.
- [9] Zollinger H., Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, 2nd Ed, VCH, 1991.
- [10] Servais P. La matière organique dans les milieux naturels. Presse de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, octobre 1999, p. 49..
- [11] Greene J.C., Baughman G.L., Effects of 46 dyes on population growth of freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*, Text. Chem. Color. 28 (1996) 23-30.
- [12] Clarke A.E., Anliker R., Organic dyes and pigments, in The handbook of environmental chemistry, Hutzinger, Editor. 1980, Springer-Verlag: Berlin.
- [13] Specht K., Platzek T., Textile dyes and finishes - Remarks to toxicological and analytical aspects, Deut. Lebensm.-Rundsch. 91 (1995) 352-359..
- [14] Carwright, Nancy. 1983b. "The Reality of Causes in a World of Instrumental Laws," :74-86
- [15] Chung K.T., Fluk G.E., Andrews A.E., Mutagenicity testing of some commonly used dyes, Appl. Environ. Microbio. 42 (1981) 641-648.

- [16] Brown, M., “predicting azo dye toxicity”, *critical review in environmental science and technology*, 1993, V 23, 294-324 p.
- [17] Journal Officiel de la République Algérienne N° 26 du 23 Avril 2006, Page 4.
- [18] DIELING Z., PENG W., QIPENG Z., NINGPING C., XIANMAO L. Thermoresponsive copolymer-based draw solution for seawater desalination in a combined process of forward osmosis and membrane distillation. *Desalination* 348 (2014) 26–32
- [19] LEIKNES T. The effect of coupling coagulation and flocculation with membrane filtration in water treatment: A review, *Journal of Environmental Sciences* 21(2009) .
- [20] AMAKRISHNA K.R., VIRARAGHAVAN T. Dye removal using low cost adsorbents, *Water Sci. Technol.* 36 (1997) 189-196.
- [21] DEGREMONT. *Mémento technique de l'eau*. Degrémont-Suez : Rueil-Malmaison, (2005) 1718.
- [22] Venceslau M.C., Tom S., Simon J.J., Characterization of textile wastewater – a review. *Environ. Technol.*, 15 (1994), pp. 917-929.
- [23] Dos Santos A., F.J. Cervantes et J.V. van Lier, (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol.*, 98, 2369-2385.
- [24] Hao O.J., H. Kim et P.C. Chiang (2000). Decolorization of wastewater. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 30, 449-505.
- [25] Galindo C., Kalt A., UV/H₂O₂, Oxidation of azo dyes in aqueous media: evidence of a structure degradability relationship, *Dyes and Pigments* 42 (1999), pp. 199-207.
- [26] 26. Hunger, K., “industrial dyes”, *chemistry properties application effect mutagenic*, 2003, 626 p.
- [27] Vaillant, J.R. (1973) *Protection de la qualité des eaux et maîtrise de la pollution*, éditions Eyrolles.
- [28] Calamari, D., Naeve, H., “ *revue de la pollution dans l’environnement aquatique Africain*”, Rome (1994).
- [29] homogeneous and heterogeneous Fenton-type catalyst”, *Today*. 200(55) 61-69 p.
- [30] Hertig, J. A., “*Etude d’impact sur l’environnement* ” V 23, ISBN 2006, p279.
- [31] Crini, G. and Badot, P.M., “*traitement et épuration des eaux industrielles polluées*”, 2007, 23 p.
- [32] Schuler, M. L., Kargi F. (1992) *Bioprocess Engineering: Basic concepts*. Edition Prentice Hall PTR.

- [33] Scriban, R. (1993) *Biotechnologie* (4eme edition) Ed. Technique et documentation Lavoisier
- [34] Billon, G. (1994) *Wastewater microbiology*. Edition Wiley-Liss, Inc
- [35] Roques, H. (1980) *Fondements théoriques du traitement biologique des eaux*, Vol.2.
- [36] Narang, A.;Konopka A.; Ramkrishna D. (1997 b) The Dynamics of microbial Growth on Mixtures of substrates in Batch Reactors. *J. theor. Biol.* 184, 301- 317.
- [37] Lobry, J. R. (1991) Ré-évaluation du modèle de croissance de MONOD. Effet des antibiotiques sue l'énergie de maintenance. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard, LYON I. 177pp.
- [38] Bréand, S. (1998) Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH. Application en microbiologie prévisionnelle alimentaire. Thèse de doctorat. Université de Claude Bernard-LYON I.
- [39] Patureau, D. (1995) Etude cinétique et physiologique d'une bactérie dénitrifiant en conditions aérobie, suivi d'un réacteur aéré, parfaitement mélangé, en culture pure et en culture mixte associé à une flore nitrifiante. Thèse de doctorat, Université de Toulous
- [40] Charles-Bajard, S. (1996) Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *Listeria monocytogenes*. Thèse de doctorat n°312-96 présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon I..
- [41] Cornu, Marie. (2000) Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes. Thèse de doctorat n°213-2000 présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon I.
- [42] Delignette-Muller, M.L. (1995) Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Thèse de doctorat n°118-95 présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon I.
- [43] Meynell GG, Meynell E. (1970). *Theory and practice in experimental bacteriology*. Cambridge University Press, Cambridge..
- [44] RAHAL K. (2005). Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle Nationale. Selon les recommandations de l'OMS ; Alger, ALGERIE, p116
- [45] Anjaneyulu, Y., Sreedhara Chary, N. and Raj, S. S. D., "Decolourization of Industrial Effluents-Available Methods and Emerging Technologies—A Review", *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*,(2005), 4-245 p.
- [46] Karcher, S., Kornmuller, A. and Jekel, M., "Screening of Commercial Sorbents for the Removal of Reactive Dyes", *Dyes Pigments*, (2001), 51-111 p.
- [47] dos Santos, A. B., Cervantes, F. J., and J. B. van Lier, "Review Paper on Current Technologies for Decolourisation of Textile Wastewaters: Perspectives for Anaerobic Biotechnology," *Bioresour. Technol*, (2007), 98-2369 p.

- [48] Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P., "Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative", *Bioresour. Technol.*, (2001), 77-247 p.
- [49] Metcalf, E., "Wastewater Engineering: Treatment and Reuse", 4th ed, McGraw-Hill, New York, USA (2003).
- [50] Alaton, A., Balcioglu, I. A. and Bahnemann, D. W., "Advanced Oxidation of a Reactive Dyebath Effluent: Comparison of O₃, H₂O₂/UV-C and TiO₂/UV-A Processes", *Water Res.*, (2002), 36-1143 p.
- [51] Wang, C. J., Hagemeyer, C., Rahman, N., Lowe, E., Noble, M., Coughtrie, M., Sim, E. and Westwood, I., "Molecular Cloning, Characterisation and Ligand-Bound Structure of an Azoreductase from *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Mol. Biol.*, (2007) .
- [52] Pearce, C. I., Lloyd, J. R. and Guthrie, J. T., "The Removal of Colour from Textile Wastewater using Whole Bacterial Cells: A Review", *Dyes Pigments*, (2003), 58-179 p.
- [53] Morawski, B., Quan, S. and Arnold, F. H., "Functional Expression and Stabilization of Horseradish Peroxidase by Directed Evolution in *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Bioeng.*, (2000), 76-99 p.
- [54] Adav, S. S., Lee, D. J. and Lai, J. Y., "Treating Chemical Industries Influent Using Aerobic Granular Sludge: Recent Development", *J. Taiwan Inst. Chem. Engrs.*, (2009), 40- 333 p.
- [55] Eichlerová, I., Homolka, L., Benada, O., Kofrončová, O., Hubáček, T. and Nerud, "Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the White Rot Fungus *Dichomitus Squalens*: Toxicological Evaluation and Morphological Study", *Chemosphere*, (2007), 69-795 p.
- [56] Saratale, G. D., Bhosale, S. K., Kalme, S. D. and Govindwar, S. P. "Biodegradation of Kerosene in *Aspergillus ochraceus* (NCIM 1146)", *J. Basic Microbiol.*, (2007a), 47-400 p.
- [57] Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D. and Marchant, R., "Microbial Decolorization of Textile- Dye-Containing Effluents: A Review," *Bioresour. Technol.*, (1996), 58-217p.
- [58] Pandey, A., Singh, P. and Iyengar, L., "Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes", *Int. Biodeter. Biodegrad.*, (2007), 59-73 p.
- [59] Guirard, J.P., "Microbiologie alimentaire", Dunod, Paris, 1998, 154-250
- [60] Martin, H., Agterén, V., "Handbook on biodegradation, biological treatment of hazardous organic compounds", amazon France, springer (1998), p-4.
- [61] Tortora, G.J., Berdell, R.F., Christine, L.C., "Introduction à la microbiologie", copyright ERPI Canada, 2003, 5 p..

- [62] Akrou, B., Hocine, N., "biodégradabilité du méthyle orange et des colorants de l'unité SOTRADAL de Boufarik : sélection des souches et mise en évidence des métabolites intermédiaires", mémoire de fin d'étude, octobre (2009)..
- [63] Bernard, J., Alain R., "Entérobactéries systématiques et méthode de diagnostic", Lavoisier, 2003, 3-4-12 p.
- [64] Bourgois, C.M., Mescle, F., Zucca, , "Microbiologie alimentaire", tome 1, 277 p.
- [65] Nigam, P., M. Banat, I., Singh, D. and Marchant, R., "Microbial Process for the Decolorization of Textile Effluent Containing Azo, Diazo and Reactive Dyes", Process Biochem, (1996), 31-435 p.
- [66] Wuhrmann, K., Mechsner, K. and Kappeler, T., "Investigations on Rate Determining Factors in the Microbial Reduction of Azo Dyes", European J. Appl. Microbiol. Biotechnol, (1980), 9-325 p.
- [67] Chang, J. and C. Lin, "Decolorization Kinetics of a Recombinant Escherichia coli Strain Harboring Azo-Dye-Decolorizing Determinants from Rhodococcus sp.," Biotechnol. Lett., 23, 631 (2001).
- [68] Bhatt, N., K. C. Patel, H. Keharia, and D. Madamwar, "Decolourisation of Diazo-Dye Reactive Blue 172 by Pseudomonas aeruginosa NBAR12," J. Basic Microbiol., 45, 407 (2005).
- [69] Saratale, R. G., G. D. Saratale, J. S. Chang, and S. P. Govindwar, "Ecofriendly Decolorization and Degradation of Reactive Green 19A Using Micrococcus glutamicus NCIM- 2168," Bioresour. Technol., 110, 3897 (2009c).
- [70] Yoo, E. S., J. Libra, and L. Adrian, "Mechanism of Decolorization of Azo Dyes in Anaerobic Mixed Culture," J. Environ. Eng., 127, 844 (2000).
- [71] Telke, A., D. Kalyani, J. Jadhav, and S. Govindwar, "Kinetics and Mechanism of Reactive Red 141 Degradation by a Bacterial Isolate Rhizobium radiobacter MTCC 8161," Acta Chim. Slov., 55, 320 (2008)..
- [72] Chang, J. S., Kuo, T. S., Chao, Y. P., Ho, J. Y. and Lin, P. J., "Azo Dye Decolonization with a Mutant Escherichia coli Strain", Biotechnol. Lett, (2000).
- [73] Joshi, T., Iyengar, L., Singh, K. and Garg, S., "Isolation, Identification and Application of Novel Bacterial Consortium TJ-1 for the Decolourization of Structurally Different Azo Dyes", Bioresour. Technol, (2008), 99-7115 p.
- [74] Chen, B. Y. and Chang, J. S., "Assessment Upon Species Evolution of Mixed Consortia for Azo Dye Decolorization", J. Chin. Inst. Chem. Engrs, (2007), 38-259 p.
- [75] Khehra, M. S., Saini, H. S., Sharma, D. K., Chadha, B. S. and Chimni, S. S., "Comparative Studies on Potential of Consortium and Constituent Pure Bacterial Isolates to Decolorize Azo Dyes", Water Res, (2005), 39-5135 p.

- [76] Saratale, G. D., Chien, I. J. and Chang, J. S., "Enzymatic Pretreatment of Cellulosic Wastes for Anaerobic Treatment and Bioenergy Production", Environmental Anaerobic Technology Applications and New Developments, H.H.-P. Fang, Ed. Imperial College Press (2010b).
- [77] Chang, J. S., Chen, B. Y. and Lin, Y. S., "Stimulation of Bacterial Decolorization of an Azo Dye by Extracellular Metabolites from Escherichia coli Strain NO3", Bioresour. Technol, (2004), 91-243 p..
- [78] Jadhav, S. U., Jadhav, U. U., Dawkar, V. V. and Govindwar S.P., "Biodegradation of Disperse Dye Brown 3REL by Microbial Consortium of Galactomyces geotrichum MTCC 1360 and Bacillus sp. VUS", Biotechnol. Bioprocess Eng, (2008b), 13-232 p.
- [79] Saratale, R. G., G. D. Saratale, D. C. Kalyani, J. S. Chang, and S. P. Govindwar, "Enhanced Decolorization and Biodegradation of Textile Azo Dye Scarlet R by Using Developed Microbial Consortium-GR," Bioresour. Technol., 100, 2493 (2009b).
- [80] Moosvi, S., Keharia, H. and Madamwar, D., "Decolourization of Textile Dye Reactive Violet 5 by a Newly Isolated Bacterial Consortium RVM 11.1", World J. Microbiol. Biotechnol, (2005), 21-667 p.
- [81] Tony, B. D., Goyal, D. and Khanna, S., "Decolorization of Textile Azo Dyes by Aerobic Bacterial Consortium", Int. Biodeter. Biodegr, (2009a), 63-462 p.
- [82] Tony, B. D., D. Goyal, and S. Khanna, "Decolorization of Direct Red 28 by Mixed Bacterial Culture in an Up-Flow Immobilized Bioreactor," J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 36, 955 (2009b).
- [83] Bras, R., Ferra, I. A., Pinheiro, H. M. and Goncalves, I. C., "Batch Tests for Assessing Decolourisation of Azo Dyes by Methanogenic and Mixed Cultures", J. Biotechnol, (2001), 89-155 p
- [84] Gulnaz, O., Kaya, A. and Dincer, S., "The Reuse of Dried Activated Sludge for Adsorption of Reactive Dye", J. Hazard. Mater, (2006), 134-190 p.
- [85] Lobry, J.R. (1991) Ré-évaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse de Doctorat n°134-91 présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon I.
- [86] Edeline, F. (1993) L'épuration biologique des eaux édition CEBEDOC. Sprl. Liège
- [87] Analyse chimique (méthodes et techniques instrumentales modernes)" Auteur: Rouessac . Editeur: Masson
- [88] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Pure & Appl. Chem. 65 (1993), 819.
- [89] G. Schwedt, Fresenius Z. Anal. Chem. 320 (1985) 423.
- [90] LEYRAL ,1998 ;Microbiologietechnique Tome1 Bordeaux : CRDPd'Aquitaine.

ANNEXES

ANNEXE C: TESTS MICROBIOLOGIQUES

1- Les milieux utilisés :

a- Gélose nutritifs :

Milieu universels pour la culture, croissance, et la numérotation des germes peu exigeant dans les eaux et les produits biologiques, sa composition et de type (g/l) :

Peptone : 10

Extrait de viande : 3

Chlorure de sodium : 5

Agar : 18

b- Gélose nutritive incliné :

Après avoir liquéfié la gélose nutritive dans un autoclave à 120 °C pendant 20 minutes, la gélose est coulée dans des tubes stérilisés incliné.

c- Le milieu d'enrichissement :

Le milieu contient les substances nutritives indispensables à la croissance des microorganismes, sa composition est en g/l :

K_2HPO_4 : 1, 6 KH_2PO_4 : 0, 2 $(NH_4)_2SO_4$: 1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0, 2

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0, 01 NaCl: 0,1 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0, 02

Pour avoir une biomasse plus abondante, on ajoute au milieu nutritif des composés énergétique tel que : Peptone: 5 g/l et Saccharose: 9g/l.

2-Technique d'ensemencement et d'isolement des bactéries :

L'obtention des cultures pures s'effectue en isolant les bactéries les unes des autres, par la méthode d'épuisement :

- Flamber la pipette puis la refroidir, éventuellement dans le couvercle de la boîte de pétri.
- Déboucher le flacon du produit à analyser dans la zone stérile du bec benzène (15 cm autour du cône bleu) et garder le capuchon dans la main droite.
- Prélever l'inoculum à l'aide de la pipette.
- Refermer le flacon de prélèvement.
- Ouvrir la boîte de pétri du côté de la flamme, en tenant de la main gauche et ensemercer selon le schéma.
- Fermer la boîte pour pouvoir la tourner pour l'ensemencement de chacun des quadrants.
- Déposer la pipette pasteur dans l'eau de javel, et, après inscription des références, incuber la boîte couvercle en bas (pour éviter que l'eau de condensation ne tombe sur la gélose).

3- Méthode de dénombrement par dilution :

Cette méthode consiste à réaliser un certain nombre de dilutions de raison 10, souvent de 10^{-1} à 10^{-9} suivant les étapes suivantes :

- 1g de la biomasse est diluée dans 1 ml de l'eau physiologique stérile.
- Cette suspension est versée dans un tube contenant 9ml de l'eau physiologique stérile pour avoir une dilution de 10^{-1} .
- 1 ml de cette solution est versé à son tour dans un tube contenant 9ml de l'eau physiologique stérile pour avoir une dilution de 10^{-2} .
- Ainsi de suite jusqu'à avoir une dilution de 10^{-9}

4-Les méthodes d'identification des bactéries :

4-1 l'identification des souches par la galerie biochimique classique :

4.1.1 Recherche du type respiratoire :

Le but de ce test, est de savoir si la bactérie est aérobic stricte, anaérobic ou aérobic facultatif, le réactif utilisé est la viande foie.

Milieu viande-foie :

L'étude du type respiratoire d'une bactérie (c'est à dire ses rapports avec l'O₂) nécessite un milieu de culture riche contenant un gradient de pression partielle en oxygène. Le principal milieu utilisé à cette fin est la gélose viande-foie (gélose VF).

Mode d'ensemencement

- régénérée la gélose VF par ébullition au bain-marie bouillant pendant environ 30 minutes.
- ensemencer lorsque le milieu est encore liquide, vers 45°C. L'ensemencement se fait à la pipette Pasteur scellée (ou boutonnée) et chargée. On introduit la pipette Pasteur au fond du tube et on remonte en spirale.
- Ne pas visser le bouchon à fond, sinon on empêche la formation du gradient de O₂.
- refroidir à l'eau courante,
- on met ensuite le tube à l'étuve (à 37°C) pendant 24 heures

Résultats :

- Type aérobic strict : culture seulement en présence de dioxygène.
- Type aéro-anaérobic : culture en présence et en absence de dioxygène. La technique utilisée ne permet pas de différencier entre les bactéries aéro-anaérobies facultatives et les bactéries anaérobies aéro-tolérantes. On conclut type aéro-anaérobic.
- Type anaérobic strict : culture uniquement en l'absence de dioxygène.



Résultats du test de VF

- Type micro-aérophile : culture seulement dans une zone de pression faible en dioxygène.

4.1.2 Recherche de l'enzyme respiratoire :

a)- oxydase :

On prépare l'inoculum et cela à l'aide d'une pipette pasteur stérilisé, on prélève une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé (des colonies jeunes 18-24h), et on l'introduit dans 5ml d'eau physiologique stérile, réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant les bactéries dans le milieu.

Prenant 1 ml de cette suspension avec pipette pasteur stérilisée et bien imbibé le disque oxydase.

Laisser agir pendant 5 minutes puis lire les résultats

Si le disque est coloré en violet, donc cette bactérie possède l'enzyme oxydase, c'est une oxydase positif, par contre si le disque n'est pas coloré c'est une oxydase négatif.



Test d'oxydase

b) catalase :

L'utilisation de l'eau oxygénée H₂O₂ dans ce test rapide permet de mettre en évidence le pouvoir de la bactérie à utiliser l'oxygène combiné dans cet oxydant : ce pouvoir s'exprime par la formation des bulles d'air



L'apparition des bulles de l'air des bulles dans la goutte d'eau oxygénée lorsqu'on étale une colonie de chaque souche indique quelles sont catalase positives



Test de catalase

4.1.3 Milieu TSI :

Le milieu de Kligler-Hajna ou milieu lactose-glucose-H₂S est le plus couramment utilisé. Ce milieu solide en pente contient du glucose (0,1%), du lactose (1%), des acides aminés, du thiosulfate de sodium, du citrate ferrique et du rouge de phénol. Ce milieu est

ensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose, puis le culot est ensemencé par piqure centrale, incubé à 37 °C pendant 24 h.

Lecture des résultats

- Les bactéries acidifient le glucose en aérobiose relative (culot) ; le culot vire au jaune comme les entérobactéries
- Si le germe n'utilise pas le lactose, la pente devient rouge par réalcalinisation du milieu due à la formation de produits alcalin provenant de la dégradation des acides aminés.
- Si les bactéries utilisent le lactose en aérobiose relative, il ya virage de la pente au jaune.
- Le milieu peut être coloré en noir de façon plus au moins intense par production d'H₂S.
- La présence de gaz est détectée par la mise en évidence de bulles ou le soulèvement de la gélose.



Test de TSI

4.1.4 Mannitol-mobilité:

Ce milieu permet l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de dégradation du mannose.

Composition :

- Peptones tryptiques de viande, Mannitol, KNO₃ et Rouge de phénol.

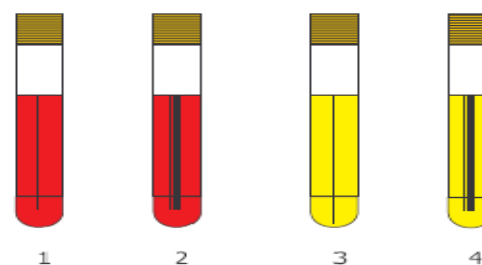
Mode d'ensemencement :

Ensemencer par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. Incuber 24 h à 37 °C Remarque : ce milieu est utilisable uniquement pour les bactéries fermentatives.

Caractères recherchés : Mannitol. Mobilité. Nitrate réductase.

Résultats : Après 24h d'incubation à 37°C

- 1 : mannitol (-) mobilité (-)
- 2 : mannitol (-) mobilité (+)
- 3 : mannitol (+) mobilité (-)
- 4 : mannitol (+) mobilité (+)



4.1.5. Milieu urée-indole :

C'est un milieu synthétique complexe fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries et autre bactéries.

Il permet la recherche de 3activités enzymatiques :

- L'uréase
- Le tryptophane désaminase (TDA)
- La production d'indole grâce à une tryptophane



Test Mannitol-mobilité

Composition

- L-tryptophane, Urée, Ethanol, Chlorure de sodium, Hydrogénophosphate de potassium, Dihydrogénophosphate de potassium, Rouge de phénol et eau distillée

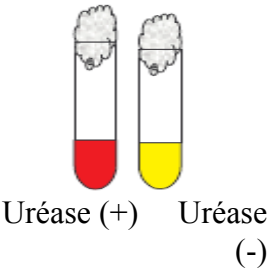
Mode d'ensemencement :

Ensemencement richement à partir de cultures solides (GO, GTS, Kliger)

Résultats :

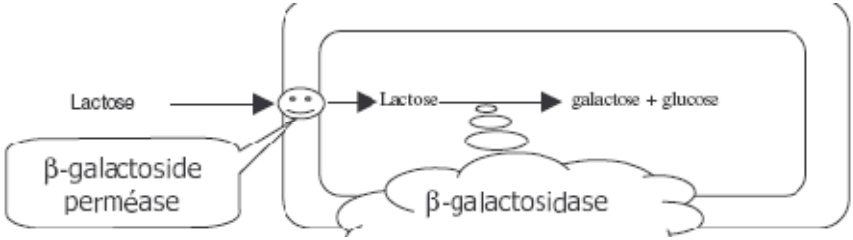
Après 24h d'incubation a 37°C

- Recherche de l'uréase :
- Recherche detryptophanase (L'indole): L'indole produit donne une coloration d'un anneau rouge en présence du réactif de Kovacs.
- Recherche de tryptophane désaminase: On ajoute quelque goutte de réactif TDA, si il ya une présence d'une coloration brune donc TDA (+).



4.1.6. ONPG

Recherche de la β -galactosidase: Ce teste permet de rechercher la présence d'une enzyme intracellulaire nommée β -galactosidase (ONPG hydrolases) qui permet l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.



Une bactérie lactose- peut l'être pour 2 raisons :

1. Absence de β -galactosidase
2. Absence β -galactoside perméase

Le test ONPG permet de rechercher directement la présence de β -galactosidase en fournissent à la bactérie un substrat de cette enzyme : l'orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside.

ONPG + H₂O → ONPG + β-D-galactopyranose

Technique:

- faire une suspension bactérienne dense en eau distillée stérile dans un tube à hémolyse.
- déposer un disque imprégné d'ONPG.
- placer au bain-marie ou à l'étuve à 37°C.
- lire après 15 min et avant 24h.

Résultat:



Test ONPG



β-gal⁻



β-gal⁺

4.1.6 Milieu Clark et Lubs:

Ce milieu permet l'étude de la voie de fermentation du glucose.

Composition :

- Polypeptones, Glucose, Phosphate bipotassique.
- pH= 7

Mode d'ensemencement : Ensemencer largement et incuber 24 h à 37 °C.

Test VP

- ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol et le même volume de soude concentrée (ou de potasse).
- incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation.
- attendre quelques min à 1 heure.

Test RM :

- ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle,
- la lecture est immédiate.

Caractères recherchés

Soit de nombreux acides par la voie des fermentations acides mixtes qui sont mis en évidence par le test RM (au rouge de méthyle),

Soit d'acétoïne produit par fermentation butanediolique qui est mise en évidence par le test VP (Voges-Proskauer)

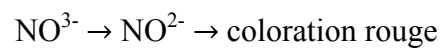
Résultats:

Test VP : Rouge : VP+ Jaune: VP-

Test RM Rouge: RM+ Jaune : RM-

4.1.8 Recherche des nitrates-réductases :

Il existe plusieurs types de nitrates-réductases mais en pratique courante, l'étude de la réaction des nitrates en nitrites se fera par la mise en évidence des nitrates formés :



Nitrate réductase réactif de Griess

Composition de réactif de Griess :

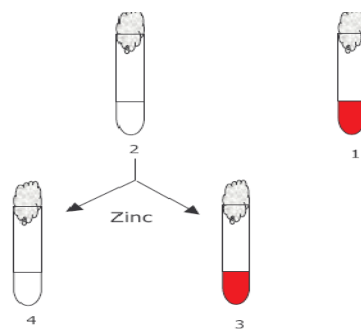
- Acide parasulfanique en milieu acide acétique (nitrite 1)
- Diméthyle- α -naphylamine en milieu acide acétique (nitrite 2)

Le milieu :

- Gélose nitratée, Bouillon nitraté
- Gélose mannitol mobilité

Technique :

Ajouter 5 gouttes des deux réactifs dans le tube. Deux résultats possibles :



Résultats :

- 1 : coloration rouge (les nitrates sont réduits en nitrite) : NR+
- 2 : pas de coloration : 2 cas possibles donc on ajoute du zinc
- 3 : coloration rouge : il reste des nitrates dans le milieu donc NR-
- 4 : pas de coloration : il n'y a plus de nitrates. La bactérie les a réduits au delà du stade nitrites : NR+

4.1.9 Citrate de Simmons :

Caractères recherchés: Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Composition :

- citrate de sodium, bleu de bromothymol, chlorure de sodium, sulfate de magnésium, hydrogénophosphate d'ammonium et agar.
- pH=7,1

Mode d'ensemencement :

La pente est ensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile. Il est important de ne pas apporter de

substrats carbonés. Ainsi l'ensemencement à partir d'une souche pure fournie en bouillon nutritif ou en eau peptonée est impossible.

Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone). Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

Résultats :

- Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons +.
- Pas de virage de l'indicateur de pH : il n'y a pas eu alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture.



Test de citrate après incubation

4.1.10 Recherche de décarboxylase : Trois décarboxylase sont fréquemment recherché :

- La lysine décarboxylase (LDC)
- L'ornithine décarboxylase (ODC)
- L'arginine dihydrolase (ADH)

Les tests correspondants sont présents notamment sur les galeries API 20 E, et les test individuel peut être effectué sur le milieu de Taylor contenant l'acide aminé étudié (soit la lysine, soit l'ornithine, soit l'arginine), du glucose et un indicateur coloré, le bromocrésol pourpre. La réaction s'effectue en deux temps :

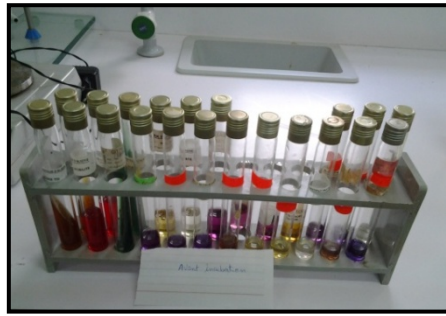
- L'orsque le glucose est fermenté, il ya virage au jaune du bromocrésol pourpre
- L'orsque l'acide aminé est décarboxylé, il ya une réalcalinisation du milieu qui vire au violet.

Lecture du résultat:

Après incubation à 37 °C pendant 24 h, un milieu

L'identification par la galerie biochimique classique :

Les photos suivantes montrent la galerie biochimique avant et après 24h d'incubation à 37°C



La souche S1 avant incubation



La souche S1 après incubation



La souche S2 avant incubation



La souche S2 après incubation



La souche S3 avant incubation



La souche S3 après incubation



La souche S4 avant incubation



La souche S4 après incubation

4.2 L'identification des souches par l'API 20 E

- A partir d'une culture pure de 18 h à 24 h, faire une suspension bactérienne ayant une concentration de 10^8 bactéries/ml dans 5 ml de saline stérile (Na Cl à 0,85 %) à un pH entre 5,5 et 7,0.
- Bien mélanger la suspension bactérienne au vortex 5 à 10 seconde, cette suspension doit être utilisée dans 15 minutes suivant sa préparation.

- Déposer 150 µl de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie en utilisant un embout stérile.
- Ajouter de nouveau 150 µl de la suspension bactérienne aux cupules CIT, VP et GEL (le totale =300 µl) par puits.
- Après l'inoculation remplir les cupules ADH, LDC, ODC, H2S et URE_d'huile minérale.
- Ajouter de l'eau dans les supports, y déposer la galerie et mettre le couvercle, et l'incuber à 37 °C pendant 18 h à 24 h.

Lecture des résultats

VP :

- Ajouter 1 goutte d'hydroxyde de potassium (40 %).
- Ajouter une goutte d'alpha-naphtol (6%)

Attendre 10 minutes, pendant ce temps, faire la lecture des autres cupules sauf TDA et IND en inscrivant la couleur et la réaction + ou -.

Lecture de la réaction VP

- **GLU** avant l'addition des réactifs, observer s'il ya présence de bulles (+ ou -) qui indiquent une réduction des nitrates à l'état gazeux N₂.
 - - Ajouter 02 gouttes d'acide sulfanilique (0,8 %)
 - Ajouter 02 gouttes de N-N diméthyle-alpha-naphthylamine (0,05 %), attendre 3 mn.
 - Pendant ce temps, faire la réaction TDA et IND.
- **TDA :**
 - ajouter 01 goutte de chlorure ferrique (10 %), lire la réaction immédiatement.
- **IND :**
 - -ajouter 1 goutte du réactif de Kovacs, lire la réaction immédiatement.
 - Lire la réaction GLU, si la réaction est négatif ajouter la poudre de zinc attendre 10 minutes et faite la lecture de cette réaction.

Légende

- ONPG : détermination de la présence de l'enzyme B-galactosidase
- ADH : transformation de l'arginine (acide aminé) par l'arginine déshydrolase
- LDC transformation de la lysine (acide aminé) par lysine décarboxylase
- CIT l'utilisation citrate comme seule source de Carbone
- H2S production du sulfure d'hydrogène (H2S) à partir de thiosulfate S₂O₃.
- URE : libération d'ammoniac à partir de l'urée grâce à l'urease.
- TDA : formation de l'acide indolepyrunique à partir du tryptophane (acide aminé) grâce à tryptophane désaminase.

- IND : formation d’indole à partir du tryptophane (acide aminé)
- VP : formation d’cétoine à partir de pyruvate de sodium
- GEL : liquéfaction de la gélatine (protéine).
- GLU (glucose), Man (mannitol), INO (inositol), SOR (sorbitol), RHA (rhamnose), SAC (sucrose), MEL (melibiose), AMY (amygdaline), ARA (arabinose), formation d’acide à, la suite de l’utilisation d’un hydrate de Carbone.

Tableau de lecture :

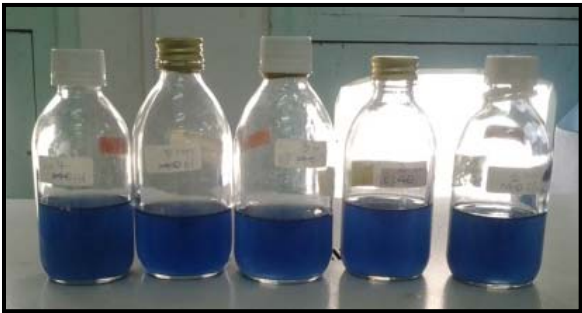
Tests	Composants actifs	Qte (mg/cup)	Réaction/enzyme	négatif	positif
ONPG	2-nitrophényl-BD-galactopyranoside	0,223	B-galactosidase (ortho Nitrophényl-BD-Galactopyranosidase)	incolore	Jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine Dihydrolase	jaune	Rouge/ orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine Décarboxylase	jaune	Rouge/ orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine Décarboxylase	jaune	Rouge/ Orangé(2)
CIT	Trisodium citrate	0,756	Utilisation du CIT rate	Vert pale /jaune	Bleu vert/ bleu
H2S	Sodium thiosulfate	0,075	Production d’H2S	incolore	Dépôt noir/fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	Jaune	Rouge/ orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane Désaminase	Jaune	Jaune
IND	L-tryptophane	0,19	Production d’INDole	Jaune	jaune
VP	Sodium pyruvate	1,9	Production d’acétoine (voges prokauer)	Jaune	jaune
GEL	Gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	Incoloe/rose pale	jaune
GLU	D-glucose	1,9	Fermentation/oxydase (GLUcose) (4)	Bleu/ bleu vert	jaune
MAN	D-mannitol	1,9	Fermentation/oxydase (MANnitol) (4)	Bleu/ bleu vert	jaune
INO	Inositol	1,9	Fermentation/oxydase (INOsitol) (4)	Bleu/ bleu vert	jaune



MO avec les différentes souches t=0h



MO avec différentes souche t=24h



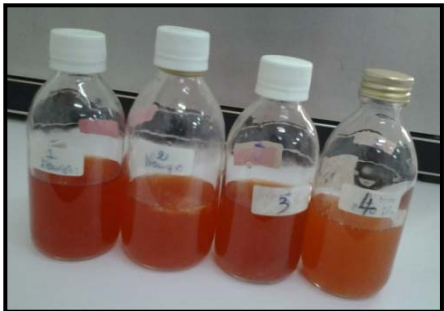
Bleu Cibacete avec les différentes souches
t=0



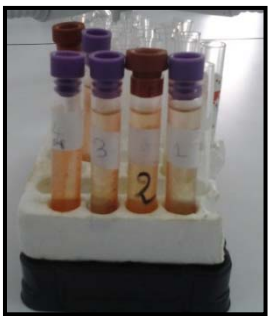
Bleu Cibacete avec les differente souche
t=48h



La degradation finale de bleu



Rouge congo avec les differentes souches
t=0



rouge congo avec les differente souche t=48



La dégradation de rouge congo dans un
milieu acide

ANNEXE B: TABLEAUX DES RESULTATS

Tableau 1: Résultats de la biodégradation du **MO** par UV-Visible à 465 nm.

Souche Temps (h)	Souche 1		Souche 2		Souche 3		Souche 4	
	abs	T %	abs	T%	abs	T%	abs	T%
0	0.433	0	0.404	0	0.395	0	0.402	0
3	0.397	8.31	0.398	1.48	0.380	3.79	0.2 97	26.11
24	0.234	45.95	0.354	12.37	0.238	39.74	0.136	66.16
28	0.201	53.57	0.238	41.08	0.212	46.32	0.094	76.61
48	0.100	76.90	0.234	42.07	0.194	50.88	0.005	98.75

Taux d'élimination (T %) = (Abso- Abst)/abs0

Avec: Abs 0 : absorbance à t = 0 ;

Abst : absorbance au temps t

Tableau 2: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du méthyle orange par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

Souche Temps (h)	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
0	0,523	0,480	0,508	0,509
3	0,922	0,692	0,798	0,984
24	1,005	0,922	1,009	1,093
28	1,111	1,089	1,082	1,209
48	1,193	1,093	1,088	1,279

Tableau 3: Variation du pH au cours de la biodégradation du méthyle orange par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

Souche Temps (h)	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
0	5,95	5,90	5,71	5,88
3	6,05	5,98	5,68	5,55
24	5,83	5,80	5,76	5,11
28	5,97	5,77	5,78	5,04
48	4,92	5,55	4,87	4,78

Tableau 4: Variation du taux de biodégradation du colorant bleu par les 4 souches bactériennes en fonction du temps par UV-Visible à 631nm

Souche Temps (Jours)	Souche 1		Souche 2		Souche 3		Souche 4	
	abs	T %	abs	T%	abs	T%	abs	T%
0	0.537	0	0.583	0	0.535	0	0.632	0
1	0.361	32.77	0.365	37.39	0.469	12.33	0.332	47.46
2	0.289	46.18	0.286	50.94	0.295	44.85	0.278	56.01
3	0.285	46.92	0.277	52.48	0.289	45.98	0.264	58.22
4	0.283	47.29	0.263	54.88	0.275	48.59	0.239	62.18
5	0.279	48.04	0.259	55.57	0.276	48.41	0.237	62.5
6	0.276	48.60	0.246	57.80	0.260	51.40	0.235	62.81

Tableau 5: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant bleu par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

Souche Temps (Jours)	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
0	0,512	0,520	0,506	0,501
1	0,663	0,657	0,651	0,656
2	0,885	0,896	0,888	0,916
3	1,099	1,183	1,098	1,405
4	1,098	1,199	1,272	1,698
5	1,188	1,201	1,277	1,709
6	1,1 98	1,513	1,434	1,7 17

Tableau 6: Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant bleu par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

Souche Temps (h)	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
0	5,26	5,16	5,20	5,54
1	5,13	5,09	4,80	5,03
2	5,36	4,98	5,67	5,87
3	5,39	5,66	5,62	6,09
4	4,99	5,70	5,66	6,62
5	5,68	5,88	5,88	7,34
6	5,7	6,03	6,13	7,64

Tableau 7: Variation du taux de biodégradation du colorant rouge par les 4 souches bactériennes en fonction du temps par UV-Visible à nm

Souche Temps (h)	1		2		3		4	
	Do	T%	DO	T%	DO	T%	DO	T%
0	0.800	0	0.898	0	0.838	0	0.732	0
2	0.404	49.5	0.380	57.68	0.256	69.45	0.210	71.31
24	0.304	62	0.273	69	0.247	70.52	0.195	73.36
48	0.241	69	0.264	70.60	0.211	74.82	0.021	97.13

Tableau 8: Variation de la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

Souche Temps (h)	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
0	0,692	0,791	1,083	1,023
2	0,922	1,023	1,237	1,471,
24	1,006	1,190	1,285	1,495
48	1,053	1,203	1,305	1,526

Tableau 9: Variation du pH au cours de la biodégradation du colorant rouge par les 4 souches bactériennes en fonction du temps

Temps (h) \ Souche	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
0	5,08	5,12	4,63	4,87
2	4,98	5,48	4,90	5,11
24	5,95	5,78	5,39	6,10
48	4,92	5,97	5,33	6,29

Tableau 10: Variation du taux de biodégradation, pH et la densité optique du colorant rouge par la S4 en fonction du temps.

Temps(h) \ Paramètres	0	2	5	24
DO	1.38	0.239	0.208	0.023
DO (620nm)	1.599	1.898	1.905	1.989
pH	6.32	5.98	5.93	5.58
T%	0	82.68	84.92	98.33

Tableau 11: Variation du taux de biodégradation, pH et la densité optique du colorant bleu par la S4 en fonction du temps.

Temps(h) \ Parameters	0	2	24	48	72
Do	0.509	0.276	0.219	0.209	0.123
DO (620nm)	1.663	1.773	1.777	1.802	1.819
pH	7.64	7.49	7.34	7.24	7.22
T%	0	45.77	56.97	58.93	75.83

Tableau 12: Variation du taux de biodégradation, pH et la densité optique du méthyle orange par la S4 en fonction du temps.

Temps(h) \ Paramètres	0	2	4	24	48
DO	0.297	0.206	0.167	0.081	0.008
DO (620nm)	1.297	1.317	1.329	1.397	1.407
pH	4.82	4.61	4.59	4.92	4.68
T%	0	30.63	43.77	72.72	97.03

Tableau 13: Variation du taux de biodégradation, le pH et la densité optique au cours de la biodégradation du colorant rouge Congo par la S4 en fonction du temps en milieu acide.

Temps(h) \ Paramètres	0	2	4	6	24
DO	1.297	0.239	0.208	0.195	0.002
DO (620nm)	0.293	0.405	0.553	0.632	0.698
pH	4.7	4.83	4.93	4.94	5.02
T%	0	81.57	83.96	84.96	99.84

RESUME

Dans ce travail, la croissance bactérienne et la biodégradation du colorants azoïque dans un milieu minimum enrichi par des entérobactéries à gram négatif et positif isolées à partir de betterave rouge, a été étudiée. L'effet de l'adaptation des bactéries aux colorants, ainsi que l'influence de l'acidification initiale du milieu sur la cinétique de biodégradation ont été déterminées. la bactérie, bacilles à Gram positif adapté au colorant a montré un meilleur taux de biodégradation pour une concentration initiale en colorant de 40mg/l.

La biodégradation des colorants testés avec la souche adaptée la plus performante permet d'atteindre des efficacités très appréciables, 98.75% pour le méthyle orange, 98.33% pour le rouge Congo et 75.83% pour le bleu Cibacte avec des cinétiques ne dépassant pas 2 jours.

Cette étude a montré que cette souche bactérienne a une très grande aptitude à biodégrader les colorant dans un milieu minimum enrichi.

Mots clés: Biodégradation, colorants azoïques, entérobactérie.

ABSTRACT

in This Work, the bacterial growth and biodegradation of azo dyes in a minimal medium enriched with enterbacteria, which is Gram- negative and positive, isolated from beet, was studied, the effect of adaptation to dyes, and the influence of initial acidification on the kinetics of biodegradation were determined, the bacterial, which is Gram positive adapted to dyes, showed a better rate of bacterial growth for an initial concentration of dyes of 40 mg/l.

The biodegradation of the dyes tested with the most efficient strain makes it possible to reach very appreciable effectiveness, 98.75% for orange methyle, 98.33% pour red congo and 75.83% pour blue cibacette with the very fast kinetics which can reach 2 days.

this study has shown that this bacterial has a great ability to biodegrade dyes in a minimal medium enriched.

Keywords: Biodegradation, azo, enterobacterium.

المخلص

في هذا العمل تمت دراسة النمو البكتيري والتفكك البيولوجي للملونات الازوتية في وسط غذائي ثري بالبكتيريا المعوية ذات صبغة غرام موجبة وسالبة بالإضافة إلى تأثير تأقلم هذه البكتيريا مع الملونات المختارة وحموضة الوسط الغذائي على التفكك البيولوجي.

سمحت لنا البكتيريا الأكثر كفاءة ذات صبغة موجبة ببلوغ فعاليات جد مشجعة (98.33%) للمثيل البرتقالي و (75.83%) و للملون الأزرق و (98.75%) للملون الأحمر، في وقت لا يتجاوز يومين علما أن التركيز الأولي للملونات كان 40 مغ في اللتر. أثبتت هذه النتائج أن البكتيريا المعوية المكيفة ذات الصبغة غرام الموجبة لها قدرة عالية على التفكك البيولوجي للملونات الازوتية المختارة.

الكلمات المفتاحية: التحلل البيولوجي، أصباغ الأزويك، البكتيريا المعوية.