

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté de technologie**

**MEMOIRE DE MAGISTER**

En génie des procédés

Spécialité : génie de l'Environnement

**BIOREMEDIATION D'UN EFFLUENT INDUSTRIEL CONTENANT DU  
METHYLE ORANGE, A L'AIDE D'UN CONSORTIUM DE  
MICROORGANISMES ISSUS DE LA BETTERAVE ROUGE**

**Par**

**M<sup>me</sup> Fella TALEB**

Devant le Jury composé de :

A. Aouabed	Professeur, USD de Blida	Président
M.Abou Saoud	MCA, U. Yahia Fares de Médéa	Examineur
D.Ghernaout	MCA, USD de Blida	Examineur
H. Boutoumi	MCA, USD de Blida	Promoteur
M.W. Naceur	Professeur, USD de Blida	Co- Promoteur

Blida, 2013.

# RESUME

La recherche de procédé sou alimenter en énergie entre dans le contexte d'utilisation d'énergie renouvelable. Il faut ajouter que le procédé utilisé n'altère pas l'environnement et l'écosystème, et par conséquent l'existence de l'homme constitue le déficit auquel les scientifiques sont confronter.

Dans cet objectif entre l'utilisation de bactéries pour le traitement de l'eau polluée, c'est ainsi que la biodégradation du méthyle orange à une concentration de 40 mg/l par le consortium bactérien d'origine végétale à partir de la betterave rouge est achevé dans une durée de 08 jours d'incubation aux températures 25 °C et 37 °C avec un taux d'élimination de 82 %.

L'isolement, la purification et l'identification des bactéries concernées à permis de sélectionner la souche la plus performante surtout après enrichissement du milieu de culture, qui à permis d'atteindre un taux d'élimination de 80 % du méthyle orange en 2h à 37°C.

L'étude du procédé de biodégradation à deux températures spécifique, à la température d'incubation 37 °C et celle de la température ambiante 25°C, a permis de mettre en évidence de l'absence du contrôle thermodynamique du procédé.

Le suivi de la biodégradation par l'étude de diminution du pH de 6,8 à 4,1. Ces valeurs montrent que les métabolites terminaux de la biodégradation sont acides au lieu que les amines comme les mécanismes proposés dans la littérature. Ces résultats sont confirmé par l'absence des aromatiques dans les analyses par chromatographie liquide à haute performance.

Mots clés : biodégradation, colorants organiques, sous produits de dégradation, pollution organique, bactéries.

# Abstract

The under powered process research enters in the context of use of renewable energy. We must add that the process does not alter the environment and ecosystem, and therefore the existence of man is the challenge to which scientists are confronting.

For this purpose enters the use of bacteria for the treatment of polluted water, that is why the biodegradation of orange methyl at a concentration of 40 mg/l by the bacterial consortium of plant origin from the beetroot is completed in 08 days of incubation at temperatures 25 ° C and 37 ° C with a rate of 82%.

Isolation, purification and identification of the bacteria involved helped to select the most efficient strain especially after enrichment of breeding ground, which helped to achieve a rate of elimination of 80% of orange methyl in 2 h at 37 ° C.

The study of the process of biodegradation 02 specific temperatures, incubation temperature 37 ° C and ambient temperature 25 ° C, helped to highlight the absence of thermodynamic control of the process.

Monitoring of biodegradation by the study of decrease of pH of 6.8 to 4.1. These values show that Terminal biodegradation metabolites are acids rather than amines as the mechanisms proposed in the literature. These results are confirmed by the absence of aromatics in the analysis by high performance liquid chromatography.

Key words: biodegradation, organic dyes, by-products of degradation, organic pollution, bacteria.

## ملخص

البحث عن الطريقة التي تستخدم الطاقة تدخل في سياق الطاقة المتجددة ,بالإضافة إلى ذلك أن هذه الطريقة لا تؤثر على البيئة و النظام الايكولوجي و بالتالي وجود الإنسان يشكل التحدي الذي يواجه العلماء ,لهذا الغرض استعملنا البكتيريا لعلاج المياه الملوثة و من ذلك طريقة التحليل البيولوجي للمثيل البرتقالي بتركيز أولي 40 مغ في اللتر بواسطة مجموعة من البكتيريا ذات المنشأ النباتي من الشمندر الأحمر , محظنين لمدة 8 أيام في درجتى الحرارة 25م° و 37م° بنسبة تفكك 82 بالمائة.

عزل و تطهير و تعريف البكتيريا المعنية يسمح بانتقاء السلالة الأكثر كفاءة خاصة بعد إثراء الوسط الغذائي مما سمح بتحقيق 80 بالمائة من التفكك للمثيل البرتقالي لمدة 2 ساعة في درجة 37م°

دراسة طريقة التفكك البيولوجي في درجتين محددتين ,في درجة التحضين 37م° و الدرجة المحيطة 25م°

سمح لنا أن نستخلص على عدم وجود الرقابة الحرارية ( الطاقة) للعملية

متابعة التفكك البيولوجي بدراسة انخفاض قيمة pH من 6,8 إلى 4,1

هذه القيم تبين أن المواد الناتجة عن التفكك البيولوجي هي حامضة بدلا من الأمينات مثل الآليات المقترحة في الدراسات

هذه النتائج تؤكد بعدم وجود العطريات بواسطة التحاليل الكروماتوغرافيا العالية الأداء للسوائل

كامات البحث التفكك البيولوجي , الملونات أعضوية المواد الناتجة عن التفكك البيولوجي ، التلوث أعضوي البكتيريا

# REMERCIEMENTS

Je commence tout d'abord à remercier mon grand Dieu, de m'avoir donné le courage, la santé, et surtout la volonté pour effectuer ce travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire des Applications Énergétiques de l'Hydrogène "LAPEH" du Département Chimie Industrielle de l'Université Saad Dahlab de Blida sous la direction de Monsieur le Dr. BOUTOUMI Hocine, Chargé de Cours à l'Université Saad Dahlab de Blida, et Monsieur NACEUR Mohamed Wahib professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida je tiens à leur exprimer mes sincères remerciements pour leur confiance de confier ce sujet particulièrement intéressant qui m'a permis d'accéder à la recherche scientifique.

Je remercie vivement tous les ingénieurs de laboratoire du département de biologie pour leur aide et encouragement.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Ben Kheda Zoubir technicien de laboratoire, et M<sup>elle</sup> Mokhtari Khadija ingénier de laboratoire d'hygiène de Blida, pour l'identification des bactéries.

Je souhaite adresser ma reconnaissance à Monsieur Lounis et M<sup>elle</sup> Farida ingénieurs de laboratoire de LANRH de Blida.

# DEDICACE

Je commence à remercier le bon Dieu, c'est grâce à lui que j'ai pu réaliser ce mémoire.

A ma mère, et mon mari qui m'ont encouragés et soutenus tout au long de mon travail.

A ma belle mère et mes belles sœurs.

A mes deux petits enfants Walid et Aymen.

A ma sœur, mon frère et leur petite famille.

A toutes les ingénieures de laboratoire de biologie, faculté Agro-Vétérinaire de l'université de Saad Dahlab.

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 pollution du fleuve Yangste par l'industrie de Textile.

Figure 2.1 Molécule anthraquinone.

Figure 2.2: Jaune 2 (colorant diphénylamine)

Figure 2.3: Jaune 11

Figure 2.4 : structure de phtalocyanine. Exemple : phtalocyanine de cuivre.

Figure 2.5: structure de l'indigo ( 2-(1,3-dihydro-3-oxo-2H-indole-2-ylidène)  
-1,2- dihydro-3H-indole-3-one).

Figure 2.6 : Structure moléculaire d'un colorant xanthène.

Figure 2.7: Structure moléculaire d'un colorant nitré et nitrosé.

Le schéma 2.9 : Méthodes de traitements des effluents.

Figure 3.1 : Phases de la croissance bactérienne.

Figure 3.2 : mécanisme de la biodégradation des colorants

Figure 5.1 : Taux d'élimination du MO à dans l'extrait de betterave en fonction  
du temps : 25°C (▲) et 37 °C(■).

Figure 5.2 : Variation de l'absorbance du MO dans l'extrait de betterave à 25°C

Figure 5.3 : Variation de l'absorbance du MO dans l'extrait de betterave à 37°C

Figure 5.4 : Variation du pH au cours de la biodégradation du MO en fonction  
du temps aux températures : (▲) 25°C et (◆) 37°C.

Figure 5.5 : Variation du pH au cours de la biodégradation de l'extrait de la betterave en fonction du temps : (▲) 25°C et (■) 37°C

Figure 5.6 : Taux d'élimination du MO par S<sub>1</sub>(◆), S<sub>2</sub> (■), S<sub>3</sub>(—), S<sub>4</sub>(▲) et ΣS(●) à T (25°C)

Figure 5.7 : Taux d'élimination du MO par S<sub>1</sub>(◆), S<sub>2</sub> (■), S<sub>3</sub>(—), S<sub>4</sub>(▲) et ΣS(●) à T (37°C)

Figure 5.8 : Mesure de l'absorbance du MO a par la souche 3 à T (25°C)

Figure 5.9 : Mesure de l'absorbance du MO par la souche 3 à T (37°C)

Figure 5.10 : Taux d'élimination du MO par S3 en fonction du temps aux températures 25°C(▲) et 37°C (■)

Figure 5.11 : Taux d'élimination du MO par S3 à 25°C(▲) et 37°C (■).

Figure : 5.12 les pics Analysés par HPLC à 25 °C

Figure 5.13 : les pics Analysés par HPLC à 37 °C

Photos 4.1 : préparation de l'extrait de betterave

Photos 4.2 : récupération de la biomasse bactérienne

Photos 5.1: S<sub>1</sub> sur GN

Photos 5.2 : S<sub>2</sub> sur GN

Photos 5.3 : S<sub>3</sub> sur GN

Photos 5.4 : S<sub>4</sub> sur GN

Photo 5.5: S<sub>1</sub> sur hektoen

Photo 5.6: S<sub>2</sub> sur hektoen

Photo 5.7: S<sub>3</sub> sur hektoen

Photo 5.8: S<sub>4</sub> sur hektoen

Photos 5.9 : S<sub>1</sub> sous microscope

Photos 5.10 : S<sub>2</sub> sous microscope

Photos 5.11 : S<sub>3</sub> sous microscope

Photos 5.12 : S<sub>4</sub> sous microscope

Photos 5.13 : S<sub>1</sub> avant incubation

Photos 5.14 : S<sub>1</sub> après incubation

Photos 5.15: S<sub>2</sub> avant incubation

Photos 5.16: S<sub>2</sub> après incubation

Photos 5.17 : S<sub>3</sub> avant incubation

photos 5.18: S<sub>3</sub> après incubation

Photos 5.19 : S<sub>4</sub> avant incubation

photos 5.20 : S<sub>4</sub> après incubation

Photos 5.21 : Api 20 E avant incubation

Photos 5.22 : Api 20 E après incubation

## LISTE DES TABLEAUX

Tableaux 1.1 : Les eaux superficielles selon OMS

Tableau 2.1: groupements chromophores et auxochromes

Tableau 3.1 : biodégradation des colorants par des bactéries pure

Tableau 3.2 : biodégradation des colorants par des bactéries mixte

Tableau 4.1 : Matériel utilisé

Tableau 4.2 : Produits utilisés

Tableau 5.1 : Paramètres morphologiques des souches bactériennes

Tableau 5.2 : Résultats de la coloration de gram et l'examen microscopique.

Tableau 5.3 : Résultats de la galerie biochimique classique

Tableau 5.4 : Lecture des résultats de la galerie API 20 E :

Tableau 5.5 : classification des souches bactériennes par les résultats  
de l'API 20 E

# TABLE DE MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
DEDICACE	5
TABLES DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	10
INTRODUCTION	13
1. POLLUTION DE L'EAU ET SON IMPACT SUR L'ENVIRONNEMENT	16
1.1 Pollution des eaux	16
1.2 Perspective mondiale de l'eau	17
1.3 L'eau et le développement durable	18
1.4 Pollution des eaux en Algérie	18
1.5 Source et transport de charge organique	19
1.6 Traitement des effluents	
1.7 Paramètres à utiliser pour mesurer la pollution organique	20
1.8 Protection des eaux	21
2. COLORANTS ET LEUR METHODES D'ELIMINATION	22
2.1 Généralités	22
2.2 Découverte du colorant	22
2.3 Classification des colorants	24
2.4 Toxicologie et toxicité des colorants	29

2.5 Aspects toxicologiques	32
2.6 Colorants azoïque et leurs métabolites	34
2.7 Méthodes utilisées pour l'élimination des colorants azoïques	34
<b>3. METHODES DE BIODEGRADATION</b>	<b>40</b>
3.1 Introduction	40
3.2 Biodégradation	40
3.3 Bactéries	41
3.4 Entérobactéries	44
3.5 Utilisation des cultures bactériennes pures	46
3.6 Utilisation des cultures bactériennes mixtes	47
3.7 Mécanisme de biodégradation des colorants	49
3.8 Facteurs affectés à la biodégradation	51
<b>4. MATERIELS ET METHODES</b>	<b>58</b>
4.1 Introduction	58
4.2 Matériels et produits	58
4.3 Méthodes expérimentales	59
<b>5. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>65</b>
5.1 Cinétique de la biodégradation du méthyle orange par le consortium bactérien	65
5.2 Isolement, sélection et purification des souches bactériennes	69
5.3 Identification des souches bactériennes	72
5.4 Utilisation des souches bactériennes à la biodégradation du MO	77

CONCLUSION

85

APPENDICE

ANNEXE A

ANNEXE B

LISTE DES SYMBOLES

REFERENCCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Introduction générale :

L'eau est un élément fondamental de la vie recouvrant 72 % de la surface de la terre, il peut être contaminée par des sources de polluants directes ou indirectes.

Les polluants déchargés dans les rejets sont toxiques à la vie aquatique des eaux naturelles qui sont contaminées et ne deviennent pas comme des sources d'eau potables.

En effet les polluants toxiques ont des impacts non seulement sur l'environnement mais aussi sur la santé humaine avec des conséquences économiques non négligeables, la pollution peut avoir des effets irréversibles sur les écosystèmes comme la disparition des espèces et la contamination de la chaîne trophique.

L'accroissement de la population mène à la prolifération rapide d'industries et leur pollution, plus de 7000 tonnes de colorants sont produites chaque année, dont plus de 5 % sont déchargés dans l'environnement aquatique, et dans les eaux usées.

Les colorants sont largement utilisés dans diverses industries comme le textile, le plastique, la nourriture, le cosmétique, le tapis et le papier. Les effluents de ces industries contenant les colorants avec des métaux, des sels qui peuvent être toxiques et même cancérigènes pour l'écosystème, les charges de cette eau usée peuvent endommager l'équilibre écologique et l'activité photosynthétique qui est due à la diminution de la pénétration de la lumière.

Les colorants azoïques sont des composés qui ont une ou plusieurs double liaisons, ils sont considérés comme des composés xénobiotiques, une large gamme de ces colorants sont utilisés à l'industrie de textile qui la représente les deux tiers du marché total des colorants, pendant le processus de coloration approximativement 10 % à 15 % des colorants sont rejetés dans les eaux usées.

La présence des colorants dans les eaux est l'un des problèmes environnementaux majeurs, ils doivent être éliminés car ce sont des polluants visibles et même à faible concentration.

Plusieurs méthodes de traitements sont utilisées pour éliminé le colorant des effluents ceux-ci incluent des méthodes physicochimiques telles que la filtration, la coagulation, l'adsorption sur charbon actif et la floculation chimique, ces méthodes sont efficaces mais elles sont couteuses et rejette une grande quantité de boue activité, qui crée un problème secondaire des processus. Ces dernières années, des nouveau processus biologiques qui introduisent l'utilisation des bactéries aérobies et anaérobies moisissures pour la dégradation des colorants et la réutilisation des eaux ont été développés.

Beaucoup d'étude récente sont consacrées pour l'utilisation des biocatalyseurs bactériens pour éliminer le colorant de l'effluent.

La biodégradation des colorants par les bactéries sous certaines conditions environnementales est très utilisée comme méthode de traitement des effluents, elle est moins couteuse et peut être utilisée dans un large domaine de colorants.

L'élimination du colorant azoïque est réalisée sous les conditions anaérobies, aérobie-anaérobie facultatif, par des bactéries de différents groupes. Le mécanisme de la dégradation bactérienne des colorants azoïques, c'est la réduction des composés azoïques par la coupure de la liaison azoïque ( $-N \equiv N-$ ) en conditions anaérobiques. La solution colorée formée contient des composés aromatiques amine dangereux. Les intermédiaires résultants du métabolisme continuent à se dégrader dans les conditions aérobies ou anaérobies.

Notre travail, s'inscrit dans le cadre de recherche à examiner la pollution des effluents industriels et leur dépollution.

Le sujet de ce mémoire rejoint l'interrogation globale suivante : <<qu'elles sont les bactéries potentiels pour la biodégradation des colorants azoïques ? >>

Pour y répondre, nous nous sommes intéressés à deux objectifs :

- Isolement, sélection, et identification des bactéries issues de l'extrait de la betterave rouge.
  
- Etude de la biodégradation du méthyle orange, en effectuant deux méthodes d'analyses
  - mesure de l'absorbance par spectrophotomètre UV visible.
  
  - suivi de la biodégradation par la chromatographie en phase liquide.

# CHAPITRE 1 : POLLUTION DE L'EAU ET SON IMPACT SUR L'ENVIRONNEMENT

## 1.1 La pollution des eaux :

### 1.1.1 Introduction :

L'eau, élément vital s'il en est aussi un agent efficace de transport et de dissémination de la pollution et des maladies c'est pourquoi nous devons prendre garde avec un soin extrême et une vigilance constante, de sa qualité et sa potabilité.

La pollution des eaux est officiellement mesurée par quatre paramètres principaux : les matières oxydables MO ; les matières en suspension (MES) ; les matières azotées et les matières phosphoré. [1]

La présence répandue de produit chimique organiques dans les effluents liquides d'industries ou urbain est un véritable problème environnemental.

La contamination de sol et de l'eau souterraine par ces produits chimique organique impose des menaces significatives aux ressources en eaux et la santé publique. Quelque type de polluants dans l'eau et le sol sont des molécules organiques complexes qui sont souvent difficiles à se dégrader, comme quelque composés phénolique, colorants. En conséquence, il ya une pression sociale croissante vers une utilisation durable d'eau et un intérêt repris dans l'amélioration de technologies existantes pour le traitement des effluents. [2]

### 1.1.2 Définition de la pollution :

Un polluant chimique est une substance toxique pour la flore, la faune et l'homme, et présente à des concentrations telles dans les milieux naturels qu'elle à des répercussions sur l'environnement et la santé. Les exemples de polluants connus que l'on retrouve dans les effluents, sont nombreux et très variés,

allant des nitrates, phosphates, détergents, produits phytosanitaires (dont les pesticides), solvant chlorés, en passant par les métaux (plomb, nickel, mercure, chrome, cadmium.....), les colorants, les produits minéraux (arsenic, cyanure, sulfure....) et les agents bactériologiques. D'autre sont moins connus mais ils sont considérer comme substance dangereuse prioritaires COV (composé organique volatil), POP (polluant organique persistants), HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), BaP (benzo (a) pyrène-dont le PCB (polychlorobiphényles), PCP (pentachloro-phénol), dioxine, pesticides.....ect. [3 ]

### 1.1.3 Définition selon l'organisme Mondiale de la santé (OMS) :

la pollution comme étant toute modification des propriétés physiques, chimiques ou biologiques, ou tout rejet de substances liquides, gazeuses ou solides dans l'eau de façon à créer une nuisance ou à rendre cette eau dangereuse de préjudiciable du point de vue, soit de la santé, de la sécurité et du bien publique, soit de ses usagés destinés à des fins domestiques, commerciales, industrielles, agricoles, récréatives et autres, soit de la faune sauvage et aquatique.

### 1.2 Perspective mondiale de l'eau :

La consommation mondiale d'eau douce à été multipliée par six entre 1900 et 1995 un rythme deux fois plus rapide que l'accroissement de la population. Un tiers environs de la population mondiale vit déjà dans les pays souffrant d'un stress hydrique modéré ou aigu en d'autres termes, la ou la consommation d'eau est supérieure à 10 % de l'offre renouvelable d'eau douce. Les problèmes sont les plus aigus en Afrique et en Asie occidentale, mais le manque d'eau est déjà une contrainte majeure qui pèse sur l'accroissement industrielle et socioéconomique dans beaucoup d'autres régions du monde notamment la chine, l'inde et l'Indonésie. En Afrique, 14 pays subissent déjà un stress hydrique ou une Pénurie d'eau, et 11 autres pays s'y ajouteront au cours de 25 prochaines années. Si les structures actuelles de la consommation on persiste, deux personnes sur trois, sur la terre vivront dans un état de stress hydrique en 2025. [4]

### 1.3 L'eau et le développement durable:

L'importance de développements à été appréciée différemment selon les époques : long temps les hommes s'était attaché essentiellement à rechercher les moyens d'augmenter les richesses et d'améliorer le bien-être, tenant ainsi de repousser les limites de la pauvreté. Cet objectif n'est pas atteint à l'heure actuelle, et d'autres problèmes s'imposent à l'humanité confronté à la dégradation des ressources naturelles et de l'environnement, mettant ainsi en péril les générations futures.

C'est notamment pour répondre a se souci de conservation de richesse naturelles telle que l'eau, que la notion du développement durable a été introduite, notion qui vise en particulier. Dans contexte, la protection de l'environnement est une priorité majeure car c'est « notre univers à tous ».

### 1.4 La pollution des eaux en Algérie :

L'Algérie parmi les vingt pays de la planète menacé d'une sécheresse sans précédent dans les années à venir. Elle doit déjà trouver des solutions aux problèmes de l'eau qui tend à se raréfier du fait des changements climatiques, de l'avancé du désert et de la poussé démographique. [5]

Notre pays vit en effet une crise sévère de son environnement. Nous savons tous combien celui-ci court le risque de menaces définitives. Ces menaces deviennent graves et se généralisent.

A Oran la pollution à fait disparaître 200 000 oiseaux (300 espèces sont recensées), soit les 4/5 de la totalité qui trouvait refuge dans les zones humides "protégée" de la wilaya, Oum El-Ghellaz, située à 25 kilomètres de la wilaya d'Oran, est la parfaite illustration d'une catastrophe écologique minutieusement préparée. Déversement des eaux usées industrielles polluée, des eaux usées des ménages, de produits toxique, installation d'une décharge d'ordure ménagères à proximité du site.....la zone humide, qui est un lieu de transit pour les oiseaux migrateurs, est connues par ses flamand rose et le barbeau de son lac. Mais aujourd'hui pas de barbeau et pas de flamand rose.

On croit savoir que 15 hectares d'Oum El-Ghellaz seront boisés afin de renforcer la flore. "Investir dans le développement durable est une nécessité". valoriser le patrimoine naturel et culturel riche et diversifié, retrouver un meilleur équilibre de ses écosystèmes et de préserver les droits et l'accès des générations futures aux ressources naturelles sont autant de devoirs à concrétiser. [6]

### 1.5 Source et transport de charge organique :

Sous l'effet des phénomènes d'érosion, l'eau de pluie charrie du sol, y compris de la matière organique dissoute et en particules, jusqu'aux cours d'eau, rivières et lacs. La décomposition de cette matière organique se poursuit durant le transport et dans les sédiments, produisant là encore de la matière organique et inorganique soluble. La quantité de matière organique transportée, ses caractéristiques et sa composition varient selon les régions. Les canalisations d'évacuation des eaux usées constituent un mode de transport artificiel de la matière organique vers les eaux réceptrices naturelles.

#### 1.5.1 Eaux usées urbaines :

D'après DEJOUX et al (1981) la pollution urbaine est généralement de nature organique et dépend pour beaucoup de l'étendue des villes, de l'existence de stations d'épuration des effluents, et des habitudes des habitants en matière d'élimination des déchets.

Les principales caractéristiques physiques, chimiques et biologiques des eaux usées traditionnelles sont connues. Mais aujourd'hui, les municipalités moderne ont des réseaux d'égouts mixtes qui, en fait, associent des quantités croissantes de matière organique et inorganique parfois toxique (comme les métaux lourds) aux effluents municipaux provenant de petites industries.

#### 1.5.2 Résidus organique d'origine industrielle :

Dans la plus part des pays développés, les industries produisent d'avantage de résidus organiques que les villes. Les industries de textiles, les moulins à pâte et papier, l'élaboration du caoutchouc et les industries chimiques produisent des déchets à forte charge DBO.

Les industries métallurgiques et les mines contribuent dans une moindre mesure à la charge organique. [7]



Figure 1.1 : pollution du fleuve yangste par l'industrie de textile (colorant rouge)

#### 1.6 Le traitement des effluents :

Il peut prendre différentes formes : processus physiques, thermique, chimiques ou biologique, y compris le tri qui modifient les caractéristiques des déchets de manière à en réduire le volume ou le caractère dangereux, à en faciliter la manipulation ou à favoriser les valorisations. Le choix d'un procédé pour le traitement des rejets dépend d'un certain nombre de facteurs dont les plus significatifs : la composition de l'effluent, le type de la réutilisation, la qualité des besoins et la dimension de l'installation. [8]

#### 1.7 Les paramètres à utiliser pour mesurer la pollution organique :

La demande chimique d'oxygène (DCO) et les solides en suspension sont les paramètres traditionnellement utilisés pour mesurer la pollution organique. Les nutriments, ont aussi leur importance. On s'est aperçu que les éléments nutritifs représentés par l'azote (N) et le phosphore (P) jouent un rôle capital dans l'eutrophisation des eaux intérieures. On les mesure sous leurs diverses formes organiques et inorganiques, par exemple

(  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^-$  ). [7]

Tableaux 1.1 : Les eaux superficielles selon OMS :

Paramètre	Unité	Excellente	Bonne	Passable	Medior	Excessive
O <sub>2</sub>	%	>90	70-90	50-70	30-50	<30
DCO	mg/l	<20	20-30	30-40	40-80	>80
MO	mg/l	<3	3-5	5-8	8-10	>10
MES	mg/l	<5	5-25	25-38	38-50	>50
NO <sup>3-</sup>	mg/l	<2	2-10	10-25	25-50	>50
NO <sup>2-</sup>	mg/l	<0,03	0,03-0,1	0,1-0,5	0,5-0,1	>1
PO <sup>4-</sup>	mg/l	<0,1	0,1-0,5	0,5-0,1	1-2	>2
Conductivité	μ /cm	<250 0	2500-3000	3000-3500	3500- 4000	<4000
Turbidité	μtn	<25	25-35	35-70	70-105	>105

### 1.8 Protection des eaux :

Une protection des milieux naturelle et aquatique exige quatre aspects :

- L'altération de la qualité des eaux par les polluants.il est possible de confiner les écoulements pollués et de traiter les eaux polluées avant de les relâcher dans l'environnement.
- La distinction qu'il faut faire entre les eaux de surface et les eaux souterraines.il est évident que la pollution des eaux de surface aura des conséquences plus immédiates et plus visible que celle des nappes souterraines.
- Les impacts affectant le régime des écoulements.il n'est pas possible de confiner les cours d'eaux ; de ce fait, on devra rétablir les liaisons coupées par une installation.
- Les fonctions écologiques des cours d'eaux, dés étang, et des lacs.les atteintes d'une installation peuvent ainsi conserver non seulement les effets

des polluants sur le milieu vital mais aussi modifier la qualité physique et biologique des milieux aquatiques. [9]

## CHAPITRE 2 : LES COLORANTS EL LES METHODES

### D'ELIMINATIONS

#### 2.1 Généralités :

#### 2.2 La découverte du colorant :

Sous la forme de goudron de houille, ou coaltar la <<nouvelle matière>> que constituait la houille à été abondamment utilisée dans l'industrie moderne de la chimie organique. En 1856 le britannique WILLIAM HENRY PEKIN (1838-1907) découvrait par hasard le colorant de synthèse à appelé pourpre d'aniline en essayant de produire de la quinine artificiel, remède contre la malaria. Le pourpre d'aniline, également appelé mauvéine, à progressivement remplacé le colorant naturel mauve. Cette découverte à marqué les débuts de très nombreuses recherche destinées à produire des colorants a base de goudron de houille. Jusqu'à cette époque les colorants entaient uniquement obtenus à partir de matière végétales ou animales. Au cours des décennies qui ont suivi, de nombreux chimistes, essentiellement Allemand, ont mis au point de plus en plus de colorants de synthèse (tel que l'alizarine ou l'indigo), qui sont progressivement devenus une solution de remplacement viable aux colorants naturels. Ces colorants de synthèse était surtout employés dans l'industrie textile. [10]

#### 2.2.1 Les colorants naturels :

La découverte de la structure de l'indigo en 1880, colorant bleu obtenu par fermentation et oxydation à l'air du suc de certaines plantes provenant des indes ou du Guatemala, plante indigogène comme l'indigofera tinctoria (légumineuse), le polygonum tinctorium (polygonacée) ou l'isatis tinctoria cruciféracée, à été pour une bonne part à l'origine de l'industrie des colorants. A partir de 1882, année de la synthèse de l'indigo, le développement de la recherche d'autre molécules dans ce domaine s'est amplifié, et à été en partie à l'origine du développement de l'industrie des colorants, tout particulièrement en Allemagne. [11]

### 2.2.2 Les colorants synthétiques :

Sont des composés organique récalcitrants, ils sont largement utilisés dans divers branche d'industrie, le textile, papier, l'industrie de tannage du cuir, les recherches agricultural, coloration des cheveux....ect. Les colorants synthétiques sont utilisés pour contrôler l'efficacité des eaux usées, le traçage des eaux souterrain et la détermination la superficie de boue activée.

Les classes chimiques des colorants utilisés plus fréquemment à l'échelle industrielle sont, les azoïques, les anthraquinones, les sulfures, l'indigo, les triphénylméthanes et les phtalocyanines.

Il ya plus de 100,000 colorants commercialisé avec une estimation de production  $7 \times 10^5$  à  $10^6$  tonne/an les données exacte de la quantité des colorants déchargé dans l'environnement ne sont pas connus, une perte de 1% à 2% à la production et 1 à 10 % perdue à l'utilisation. Des statistiques ont confirmé que l'application extensive des colorants synthétiques cause une pollution environnementale considérable, et ils sont dangereux pour la santé et les organismes vivants. [12]

### 2.2.3 L'utilisation et la description du colorant azoïque :

Le marché mondiale des colorants est approximativement 700,000 tonnes par an. Au moins 10% de ces colorants sont déversé dans l'environnement, les industries de textile sont maintenant les plus dangereux pollueur, les colorants azoïques sont utilisé pour colorée le coton, ce sont des composés aromatique contenant des groupes azoïques (-N=N-) et plusieurs substituant d'une simple liaison comme les amino- (-NH<sub>2</sub>), chloro- (-Cl), hydroxy- (-OH), methyl- (-CH<sub>3</sub>), nitro- (-NO<sub>2</sub>) et sels sodiques d'acide sulfoniques acide (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>). Les rendements de fixation sont bas (50-90%) en raison d'hydrolyse dans les bassins de coloration. [13]

### 2.3 Classification des colorants :

Il existe en effet des milliers de colorants textiles commercialisés sous le nom différents (jusqu'à 30 % d'entre eux), et le Color Index (CI) ne contient pas toutes les informations à leur sujet. La couleur d'un textile résulte souvent d'un subtil mélange de plusieurs colorants. Pour cette raison, des mélanges à priori inattendus de colorants peuvent être employés comme jaune+rouge+orange ou le rouge des vêtements respectivement noirs ou bleu.

Par exemple le colorant Seriol Black L 1994, utilisé pour teindre en noir « velours » contenant 5 colorants dispersés : bleu 124 et 106 rouge, jaune 3 et bleu 1 (5) en outre, un colorant commercial comporte souvent un ou deux composants principaux et des impureté.[14]

La classification des colorants se fait soit selon leur classification chimique, soit leur modalité d'utilisation. Selon Leur structure chimique et le système de classification du Color Index, les colorants peuvent être classés en 17 groupes : nitré, dérivés de l'acridine, dérivés de la quinoléine, azines, anthraquinones, colorant indigoïdes, colorants phtalocyanines, base d'oxydation, précurseurs insolubles des colorants azoïques. [15, 16]

#### ➤ Classification chimique

Le classement des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du Groupement chromophore

Tableau 2.1: classement des colorants selon leur structure chimiques

Chromophores	Auxochromes
Azo (-N=N-)	Amino (-NH <sub>2</sub> )
Nitroso (-N=O ou -N-OH)	Méthylamine (-NHCH <sub>3</sub> )
Carboxyl (-C=O)	Diméthylamine (-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )
Vinyl (-HC=CH-)	Hydroxyl (-OH)
Nitro (-NO <sub>2</sub> )	Alloxyl (-OR)
Sulfures (>C-S)	Groupement donneurs d'électrons

### 2.3.1 Les Colorants azoïques :

C'est en 1863 que Mitscherlich découvre l'azobenzène  $C_6H_5-N=N-C_6H_5$ , mais c'est PETER GRIESS qui effectue les premiers travaux systématiques à partir de 1858 en donnant la Méthode de préparation très générale de ces produits.[17]

Le groupement chromophore (-N=N-) a été découvert par P.Griess en 1858. Suivant le nombre de chromophores « azo » rencontrés dans la molécule, on distingue les mono-azoïques, les diazoïques et les poly azoïques.

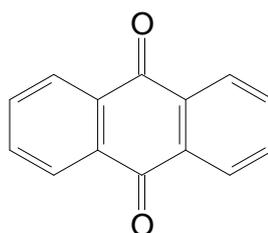
Les colorants azoïques sont caractérisés par la présence au sein de la molécule d'un groupement azoïque (-N=N-) reliant deux noyaux benzéniques. Cette catégorie de colorants est actuellement la plus répandue sur le plan de l'application, puisqu'ils représentent plus de 50% de la production mondiale de matières colorantes [18,19]. Les colorants azoïques se répartissent en plusieurs catégories ; les colorants basiques, acides, directs et réactifs solubles dans l'eau, et les azoïques dispersés et à mordant non-ioniques insolubles dans l'eau.

On estime que 10-15% des quantités initiales sont perdues durant les procédures de teinture et sont évacuées sans traitement préalable dans les effluents [19].

### 2.3.2 Les colorants anthraquinoniques :

Les colorants anthraquinoniques sont d'un point de vue commercial, 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. Ces produits sont utilisés pour la coloration des fibres polyester, acétate et tri acétate de cellulose. Ils constituent en effet la classe de colorants présentant la plupart du temps les meilleures stabilités à la lumière et aux agents chimiques.

La molécule de base de ce groupe de colorants est l'antraquinone qui présente le groupe chromophore carbonyle ( $>C=O$ ) sur un noyau quinonique, qui est le Chromogène [20].

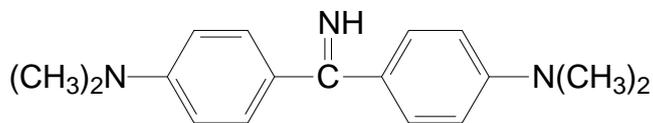


**Figure 2.1:** Anthraquinone (*9,10-dihydro-9,10-dioxoanthracène*)

### 2.3.3 Les colorants du diphénylamine et du triphénylméthane :

Les colorants triphénylméthanes dérivent du triphénylméthane, qui est un Hydrocarbure possédant trois cycles phényle liés a un carbone central. On retrouve cette structure de base dans un grand nombre de composés organiques colorés. Les colorants triphénylméthanes et leurs dérivés hétérocycliques constituent la plus ancienne classe de colorants synthétiques. Actuellement bien moins importants que les colorants azoïques et anthraquinoniques, ils ont conservé une certaine valeur commerciale, car ils permettent de couvrir la totalité de la gamme de nuances. Les triphénylméthanes sont utilisés intensivement dans les industries papetières et textiles pour teindre le nylon, la laine, la soie et le coton. Leur utilisation ne se limite pas à l'industrie. On les retrouve également dans le domaine médical comme marqueurs biologiques et comme agents antifongiques chez les poissons et la volaille.

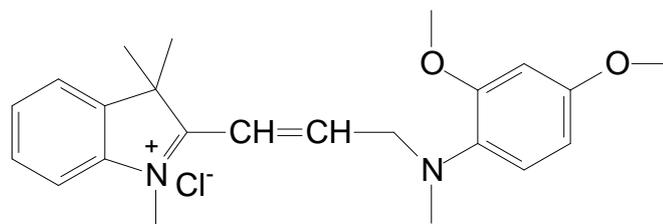
Un exemple d'un tel colorant est le jaune 2 :



**Figure 2.2:** Jaune 2 (colorant diphénylamine)

### 2.3.4 Les colorants polyméthiniques :

Un exemple important de colorant polyméthinique pour lequel le groupe Chromophore est (-HC=X) ou (-RC=X) est le jaune 11 dont la formule est la suivante :



**Figure 2.3:** Jaune 11

### 2.3.5 Colorants au soufre :

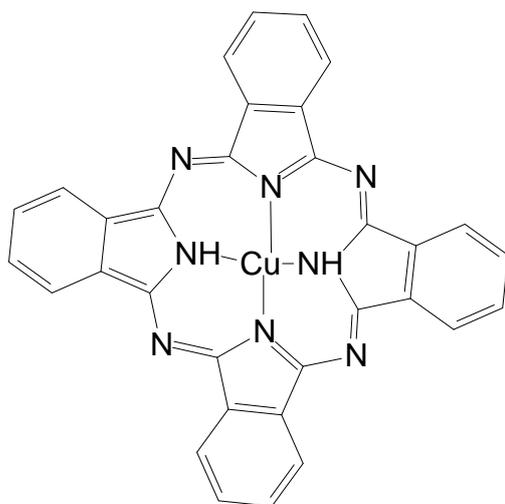
Ce sont des colorants de haut poids moléculaire, obtenus par la sulfuration de combinaisons organiques. Ils sont transformés en leuco dérivé sodique par réduction à l'aide de sulfure de sodium. Les colorations obtenues ont une bonne résistance à la lumière ainsi qu'à l'eau ; par contre, ces colorants ne sont pas résistants au chlore [21].

### 2.3.6. Les colorants d'alambic :

Ces colorants donnent une couleur bleue (bleu ciel intense), stable à la lumière et à différentes actions chimiques et thermiques. Ayant des groupements carbonyles, ils sont insolubles dans l'eau. La forme énolique est appelée leuco-composé et, sous l'action d'une base, se transforme en forme soluble, alors utilisable [22].

### 2.3.7 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.). Parmi les phtalocyanines, le colorant le plus utilisé est la phtalocyanine de cuivre, qui est le plus stable. Les applications les plus importantes concernent le domaine des pigments [21]



**Figure 2.4** : structure de phtalocyanine: (phtalocyanine de cuivre).

### 2.3.8 Les colorants quinoléiques :

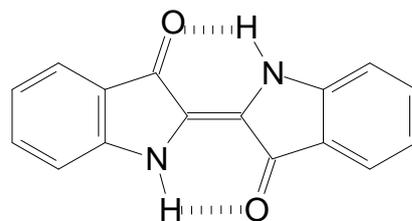
La structure principale des colorants quinoléiques est basée sur les aryles substitués de n-quinoléines et n-quinoldiamine. Cependant, les deux produits sont insolubles seulement lors de la substitution de l'hydrogène des groupements imino par les radicaux suivie de l'acquisition d'une coloration à l'action des acides et des bases [17]. On les utilise dans le domaine de l'industrie du cuir et de la fourrure (tanneries).

### 2.3.9 Colorants indigoïdes :

Les colorants indigoïdes tirent leur appellation de l'indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues séléniés, soufrés et oxygénés du bleu indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquoise.

Un colorant indigoïde est celui dont la coloration est une variante de l'indigo (bleu-violet). Les colorants indigoïdes sont utilisés comme colorants textiles, comme additifs en produits pharmaceutiques en confiserie, ainsi que dans les diagnostics médecine [23].

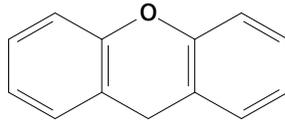
Le plus important des colorants indigoïdes est l'indigo lui-même, qui a la structure Suivante :



**Figure 2.5:** structure de l'indigo

### 2.3.10 Les colorants xanthènes :

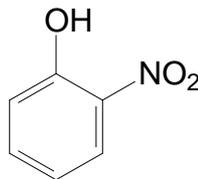
Ce sont des composés qui constituent les dérivés de la fluorescéine. Ils sont dotés d'une intense fluorescence. Peu utilisés en tant que teinture, leur faculté de marqueurs lors d'accidents maritimes ou de traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines est malgré tout bien établie. Ils sont aussi utilisés comme colorants alimentaires, cosmétiques, textiles et impression. [24,25]



**Figure 2.6** : le colorant xanthène.

### 2.3.11 Les colorants nitrés et nitrosés :

Ils forment une classe de colorants 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 nitré (-NO<sub>2</sub>) en position ortho d'un groupement électro-donneur (hydroxyle ou groupes aminés). [26]



**Figure 2.7:** Structure moléculaire d'un colorant nitré.

### 2.4 Toxicologie et toxicité des colorants :

Aujourd'hui l'analyse d'un produit qui doit être commercialisé est un moyen technique non seulement pour l'identification et l'application de ces propriétés, mais aussi pour comprendre et étudier l'écotoxicité et son impact écologique.

Les colorants ne sont pas une exception des processus industriel, les utilisateurs sont toujours en face à la question de la production et l'utilisation d'un colorant spécifique qui pourrait présenter de façon acceptable un effet toxicologique ou écologique pour l'homme et l'environnement.

La limitation ou au moins la réduction de ces effets sont très importantes, les critères doivent être développés pour chaque cas avec le respect du niveau de disposition.

L'évaluation et la connaissance des propriétés physiques, chimiques, toxicologiques et écologiques du colorant est essentiel pour estimer l'impact sur l'environnement, et l'utilité d'un produit qui présente un potentiel dangereux.

Il est important aussi d'estimer le type de traitement, l'utilisation d'un colorant va probablement subir une mesure d'exposition humaine que l'on pourrait s'attendre et impliqué en amont.

La principale estimation dans la fabrication et l'utilisation des colorants comme beaucoup de produits chimiques c'est considérer la sécurité personnelle, les émissions atmosphériques, la qualité des eaux usées, et l'élimination des déchets convenablement. [27]

#### 2.4.1 L'impact des rejets industriels sur l'environnement :

Les rejets d'effluents des industries textiles, chargés en colorants, dans les rivières, peuvent nuire considérablement aux espèces animales, végétales ainsi qu'aux divers microorganismes vivant dans ces eaux. Cette toxicité, donc, pourrait être liée à la diminution de l'oxygène dissout dans ces milieux. Par ailleurs, Leur très faible biodégradabilité, due à leur poids moléculaire élevé et à leurs structures complexes, confère à ces composés un caractère toxique pouvant être élevé ou faible. De ce fait, ils peuvent persister longtemps dans ce milieu, engendrant ainsi des perturbations importantes dans les différents mécanismes naturels existant

Dans la flore (pouvoir d'auto épuration des cours d'eau, inhibition de la croissance des végétaux aquatiques...) et dans la faune (destruction d'une catégorie de poissons, de microorganismes...).

Dans ces conditions la dose létale (DL50) reste le meilleur paramètre pour évaluer les effets toxiques causés par ces déversements. Ainsi, une DL50 signifie la mort de 50% des espèces animales testées en expérimentation [28].

Les données bibliographiques ont mentionné que :

- ❖ Les algues peuvent être inhibés (à 35%) ou stimulés (à 65%) par les rejets d'effluents dans les industries textiles. Ces résultats ont été obtenus lors des prélèvements effectués sur la coté Est des U.S.A [28,29].

- ❖ Le colorant "noir de l'uxanthol G" est très nocif pour les jeunes guppies à la concentration de 5mg/l.
- ❖ La fuchsine inhibe la croissance des algues et des petits crustacés pour des concentrations minimales de 1mg/l et 20mg/l respectivement.
- ❖ Le bleu de méthylène est toxique pour les algues et les petits crustacés à partir des concentrations de 0,1 mg/l et 2 mg/l respectivement [28,30].
- ❖ Le bleu de victoria, le violet de méthyle, le noir anthracite BT et le vert diamant sont très toxiques pour la faune et la flore à partir de concentrations de 1mg/l [30].
- ❖ Les colorants cationiques (ou basiques) sont généralement très toxiques et résistent à toute oxydation. En effet, d'autres études ont montré que le colorant cationique (sandocryl orange) est très toxique pour les micro-organismes. En effet, après un temps de contact de 5 jours, le taux d'inhibition a été de l'ordre de 96,5%. Ce taux, est cependant plus faible avec le colorant acide, le Lanasyn Black (32,8%) et pratiquement nul avec un autre colorant de cette même famille, le sandolan [28,31].

Donc, le traitement des effluents chargés en colorants s'avère indispensable pour la sauvegarde de l'environnement.

Une des plus graves conséquences de l'usage des colorants synthétiques réside en des effets cancérigènes suite à leur ingestion répétée. Ainsi, beaucoup de ces dangereux composés ont été mis en évidence après une expérimentation rigoureuse sur les animaux.

Nous citons quelques exemples :

- ❖ Les colorants azoïques, le rouge écarlate, le soudan III, l'orange SS (orange gras TX), l'amarante, le jaune AB, le jaune OB, le rouge ponceau, le soudan I, le rouge citrus etc....

- ❖ Les dérivées du triphénylméthane tel que le vert lumière SF, le vert solide, le vert guinée, le bleu patenté (V), le violet cristallisé etc. ...
- ❖ Les dérivées du diphénylamine comme l'auramine.
- ❖ Les dérivées de la phtaléine comme l'éosine, la fluorescéine, la rhodamine B etc. [32]

## 2.5 Les aspects toxicologiques :

Les études de la toxicologie concernent différents aspects : principalement la toxicité aiguë, (l'irritation de la peau et les yeux), la toxicité après une application répétée, la sensibilisation, la mutagénicité et la cancérogénicité.

### 2.5.1 La toxicité aiguë :

Pour déterminer un colorant est-il dangereux ou non, la première étape est l'évaluation appropriée du test de la toxicité des colorants qui est définie par la directive 67/548 EEC, un examen complet sur toutes les données incluant l'irritation de la peau et les yeux, un numéro tiré de la fiche technique de sécurité montre que les potentiels qui ont un effet de toxicité aiguë ou nuisible sont très bas, bien que cet examen provient depuis longtemps, le résultat est toujours valable jusqu'à aujourd'hui.

### 2.5.2 La sensibilisation :

Les dermatologues ont rapportés des cas suspects de réaction dermique causés par les colorants de textile, il y a une évidence que quelque réaction de colorants cause aux travailleurs d'industrie de textiles, une dermatite de contact, une rhinite allergique, une asthme professionnel ou d'autres réactions allergiques, en 1985 des études ont été entreprises sur 414 travailleurs exposés aux colorants, comme les peseurs, les mixeurs, les magasiniers, les opérateurs de teinturerie et le personnel du laboratoire, 21 parmi eux ont identifiés des symptômes allergiques incluant un asthme professionnel dû à un ou plusieurs colorants.

### 2.5.3 Mutagénité et concérogénité :

Quelque colorants exposants un potentiel mutagénique, un moyen de test est utilisé pour dépister la substance mutagénique, c'est un test du point d'activité de mutation bactérienne avec des souches spécifique « salmonella typhimirium » sa croissance dépend de l'acide aminé l'histidine, la dose de croissance assimilé est le marqueur du point de mutation.

Trois mécanisme différent été identifié, par les colorants azoïque concérogène, toute l'activation impliqué aux réactive intermédiaire électrophile qui est liée avec l'ADN par une liaison covalente, ces liaisons sont :

- Des colorants azoïques qui sont toxique seulement après la réduction et la coupure de la liaison azoïque pour donner des amines aromatiques, surtout les bactéries intestinal anaérobie, les amines aromatiques sont oxydé par des réactif électrophiles qui forme une liaison covalente avec L'ADN.
- Des colorants azoïques qui ont des structures contenant des groupes aromatiques amines libre qui peuvent être métabolisé et oxydés sans la réduction azoïques.
- Des colorants azoïques peuvent êtres activée par l'oxydation directe de la liaison azoïque, avec un réactif électrophile sel de diazonuim.

Chaque mécanisme peut être un composé spécifique, la toxicité azoïque est probablement causé par plusq'un mécanisme, bien que ce n'est pas évident de prévoir la concenogénité d'un colorant azoïque avec une certitude absolue, mais c'est possible d'établir certain directives, parceque certaines espèces bactériennes anaérobies peuvent réduire n'importe quel composé aromatique amine azoïque, ceux contenant des sous groupes, des amino aromatique connus qui peuvent être concerigène, comme le benzidine qui est un suspect.[33]

## 2.6 Les colorants azoïques et leurs métabolites :

Les décharges des effluents de textiles contenant des colorants azoïques et leurs métabolites sont esthétiquement désagréable aux écosystèmes aquatiques et aide à la réduction de l'activité photosynthétique, la dissolution de la concentration de l'oxygène, et la qualité de l'eau, et cause des effets de toxicité aiguë à la flore et à la faune aquatique qui est un sérieux problème environnemental universel. [34]

L'addition des colorants azoïque à aussi un impact adverse à la teneur du Carbone organique total (TOC), la demande biologique d'oxygène (BOD) et la demande chimique d'oxygène (COD).[35]

De nombreux colorants azoïque synthétique et leur métabolites sont toxiques, cancérigène et muta génique [36], de plus, de nombreux rapport indique que les effluents des colorant azoïques ont un effet toxique sur le taux de germination et la biomasse de divers espèces de plantes qui ont un rôle écologique important, ainsi un appauvrissement de l'habitat de la faune et la flore, la protection contre l'appauvrissement de la matière organique à une importance significative pour la fertilité du sol.[37]

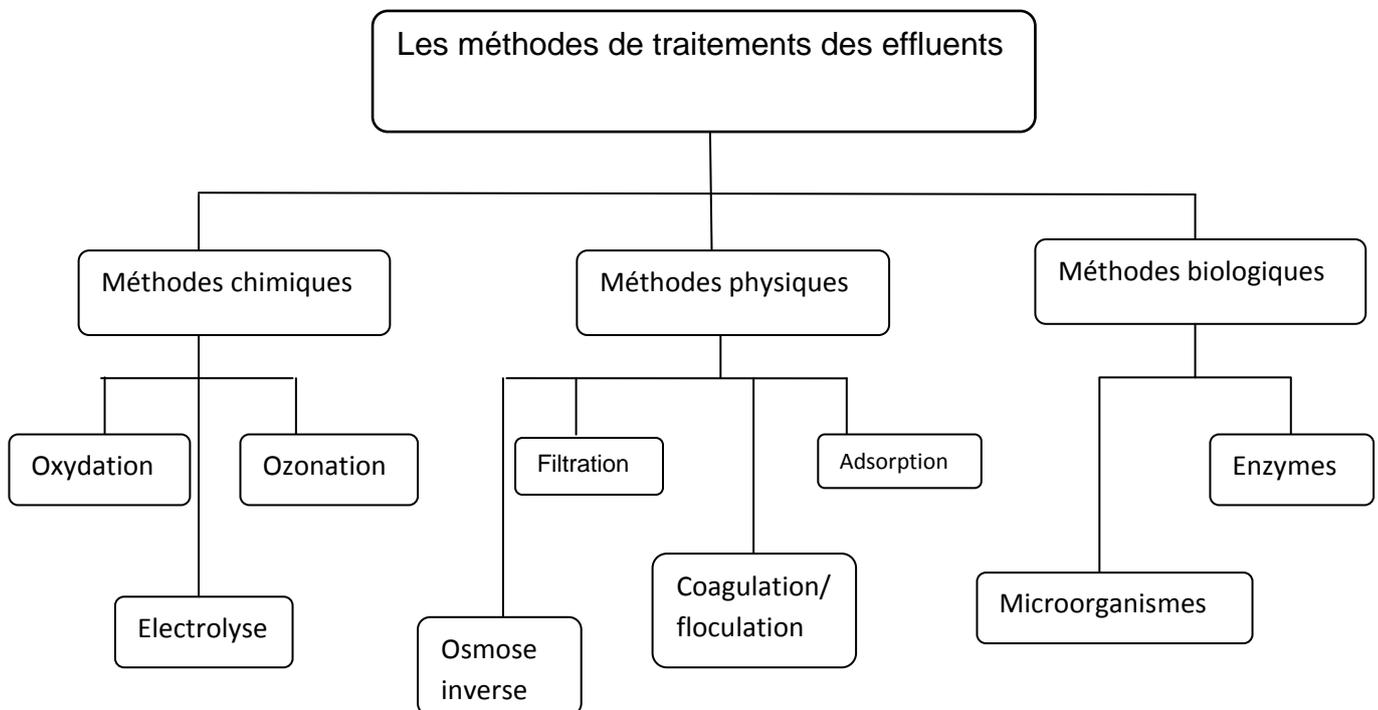
Le traitement des effluents industrielle contenant des colorants azoïques et leur métabolites est une nécessité prioritaire avant de les déchargé vers l'environnement.

## 2.7 Les méthodes utilisées pour l'élimination des colorants azoïques :

Différentes méthodes physicochimiques sont utilisées pour l'élimination du colorant azoïque à partir des effluents des eaux usées. Par ailler l'application des méthodes physiques/chimiques ont des inconvénients de devenir irréalisable économiquement, car il consomme beaucoup d'énergie et produits chimiques, l'élimination incomplète des colorants azoïques et leur métabolites organiques, forme une grande quantité de boue et peut causer un problème de pollution secondaire qui implique une complication de procédé. [38, 39]

D'autre part la dégradation microbienne ou enzymatique ne cause pas des effets nuisible pour l'environnement, elle est moins couteuse comparé au procédé de décomposition chimique, et elle à un pouvoir de réduire la consommation de l'eau comparé à la méthode de traitement physicochimique [40, 41]

Le schéma suivant récapitule les différentes méthodes pour le traitement des effluents :



### 2.7.1 Les méthodes physique :

#### ➤ Elimination par coagulation-floculation:

Elle est efficace pour l'élimination principalement des sulfures et les colorants dispersés, mais sa capacité est très limité pour les colorants acides, directe, réactifs, de plus de son faible rendement et sa production d'une grande quantité de boues, sont des limites pour l'application de cette méthode.

➤ Elimination par adsorption :

Elle est considérée intéressante, cela due à son efficacité importante pour l'élimination d'une large gamme de colorants, la sélection de l'adsorbant est basée sur la caractérisation des composés qui ont une grande affinité et une possibilité d'être régénéré [42], bien que le charbon active (AC) soit une adsorbante très efficace pour les différents type des colorants, il n'est pas utilisé souvent due de son cout élevé [43], pour rendre ce procédé économique, certain investisseurs utilise des adsorbants moins couteux comme la tourbe, la bentonite, les résines polymérique, les échangeurs d'ion et plusieurs matériel biologique comme le blé/épi de maïs, tige de maïs et le paille de blé pour l'élimination du colorant des eaux usées [44], donc l'application de ces adsorbants sont limité à cause des contraintes liées à leur disponibilité, régénération, production une grande quantité de boues en amont, faible efficacité estimé d'une large gamme de colorants et le cout élevé [45, 46]

➤ Elimination par filtration :

L'ultrafiltration, la nano filtration et l'osmose inverse sont utilisées pour les eaux réutilisées, dans l'industrie de textile l'utilisation des membranes donne de bons résultats pour la séparation et l'hydrolyse des produits de teinture et réduit simultanément la couleur, DOD et COD des eaux usées,

Dans ce contexte la sélection du type et la porosité du filtre dépend de la composition chimique des eaux usées et la température spécifique adéquates [47], donc les membranes ont certains inconvénients y compris le cout d'investissement la capacité de la membrane et la production des résidus secondaire versés qui nécessite un autre traitement<sup>2</sup>. [47, 48]

### 2.7.2 Les méthodes chimiques :

➤ L'oxydation permet la destruction des molécules colorées et utilise des différents réactifs oxydateurs comme l'ozone ( $O_3$ ), le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et le permanganate ( $MnO_4$ ), la modification de la composition chimique ou des groupements des composés en présence de ces oxydants, donc la dégradation devienne susceptible [49]

L'ozonation n'est plus considéré efficace, cela due à

- sa capacité de réagir avec beaucoup de colorants azoïques.
- l'absence de la modification du volume de la réaction due à son état gazeux [50]
- sa courte durée de vie et son inefficacité à la dispersion des colorants et leur insolubilité dans l'eau,
- faible capacité d'élimination de la DCO.
- le cout élevé de l'ozone. [45]

➤ procédé d'oxydation avancé (AOP photochimique et photo catalytique), les réactifs oxydateurs comme  $O_3$  et  $H_2O_2$  ou les photo catalyseurs hétérogènes sont utilisés avec des catalyseurs comme  $TiO_2$ ,  $ZnO_2$ , Mn et Fe en présence ou l'absence de la source de radiation qui génère les radicaux ( $OH^\cdot$ ) pour la destruction les polluants de colorants dangereux. [45, 38, 34, 51], la méthode de réaction de fenton et relativement moins couteuse et à également une bonne efficacité de réduction de la DCO à la fois les colorants solubles et insolubles, mais la production élevée de boues associé à cette approche limite également son utilisation [43] , le procédé  $H_2O_2/UV$  est la technique (AOP) la plus efficace, en raison du taux élevé d'élimination des colorants (jusqu'à 95%),absence de formation de boues et une bonne réduction de DCO dans un temps de rétention court.[50]

Par contre elle est moins efficace pour les eaux usées fortement colorées et dispersées ou les colorants de cuve, elle conduit également à la formation des sous produits indésirables, bien que l'utilisation inefficace de la lumière UV augmente le cout de fonctionnement de ce procédé [52]

➤ Oxydation électrochimique :

C'est une méthode très efficace pour l'élimination des composés organiques, ne forme pas des sous produits dangereux, mais le haut cout d'électricité nécessaire à également limité l'utilisation de ce procédé [53].

La majorité des techniques de l'élimination de colorant travaillent soit en concentrant le colorant dans la boue ou par la destruction des molécules colorées, en conséquence une méthode de boue granulaire aérobie a été proposée. [54]

Les différentes méthodes physiques/chimiques présentées ci-dessus pour traiter les eaux usées contenant des colorants ont quelques inconvénients, comme étant irréalisable économiquement, elles ne sont pas capables d'éliminer complètement les colorants azoïques récalcitrants et /ou leurs métabolites organiques en raison de la stabilité et la résistance des colorants azoïques à la dégradation, [45]

La régénération d'une quantité de boues en amont cause un problème de pollution secondaire, augmente sensiblement le coût de ces méthodes de traitement, et impliquant des procédures compliquées. [55, 38, 39]

### 2.7.3 Les méthodes biologiques :

La bioremédiation ou l'utilisation des techniques microbiennes pour traiter la pollution, est le principal domaine de recherche dans la science de l'environnement, les microbes adaptés sont eux-mêmes toxiques dans les rejets, des nouvelles souches résistantes se développent naturellement avec lesquelles se transforment des différents composés chimiques toxiques en produits moins toxiques,

Le mécanisme de la biodégradation des composés récalcitrants dans le système microbien est basé sur l'action de transformation des enzymes [56]

Plusieurs rapports démontrent que la dégradation des substances organiques complexes peut être réalisée avec des mécanismes enzymatiques, comme celle liée avec Laccase, lignine peroxydase, NADH-DCIP réductase, tyrosinase, hexane oxydase et aminopyrine N-déméthylase.

Un nombre des méthodes biotechnologiques sont intéressées de s'occuper de la pollution des colorants d'une manière efficace principalement avec l'utilisation des bactéries et fréquemment avec la combinaison par les procédés physicochimiques.

Les colorants azoïques sont xénobiotiques dans la nature et récalcitrants à la biodégradation, et l'utilisation la méthode de traitement microbien ou enzymatique pour une décoloration et dégradation complète a les avantages suivants :

- Elle est considérée favorable pour l'environnement.
- Elle est moins couteuse.
- Produit moins de boues.
- Les sous produits de biodégradation sont non toxique ou ils sont complètement minéralisés.
- Consomme moins d'eau comparée aux méthodes physicochimiques. [57, 40]

L'efficacité de la décoloration microbienne dépend de la capacité et l'activité de la sélection des microorganismes, par conséquence un grand nombre d'espèces à été testé par la décoloration et la minéralisation des différent colorants azoïques dans ces dernières années. [58]

Une large variété des microorganismes sont capable de décolorée une large gamme de colorants parmi eux les bactéries, les champignons, les levures, les actinomycètes, les algues et les plantes.

# CHAPITRE 3 : LES METHODES DE BIODEGRADATION BACTERIENNE

### 3.1 Introduction :

L'accumulation de rejets de toutes sortes dans l'environnement est devenue un sujet de préoccupation majeure depuis plusieurs décennies. Elle a donné lieu à une forte prise de conscience dans les pays développés qui en sont les premiers responsables.

La course pourrait sembler perdue d'avance au vu de la formidable progression des activités industrielles, de la consommation et du développement de l'agriculture intensive. La pollution va des emballages aux produits chimiques utilisés comme pesticides et herbicides, en passant par les nitrates, les hydrocarbures et les métaux lourds. Les micro-organismes contribuent largement à les détruire ou à les neutraliser malgré leurs limites. Tous les êtres vivants participent à des degrés divers au recyclage des matières organiques et minérales de l'environnement. Par leur aptitude à coloniser tous les milieux, les micro-organismes viennent au premier rang. Bactéries, champignons, micro algues et protistes forment une gigantesque usine chimique planétaire dont les produits se propagent tout au long des chaînes nutritionnelles. Un premier choix a été de ne considérer majoritairement que les bactéries, ou plus exactement les procaryotes en général. [33]

### 3. 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. [60]

#### ❖ 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. [61]

#### ❖ Les entérobactéries saprophytes :

Les entérobactéries saprophytes sont présentes dans les sols, les eaux, les végétaux et dans tout type d'environnement humide en général, elles participent à la dégradation des matières organiques. On compte parmi celles-ci les proteus, les providencia, entérobacter, serratia, hafnia, qui sont plus adaptés à l'environnement.

#### 2.4.3.2 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)

#### 2.4.3.3 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. [61]

#### 2.4.3.4 Taxonomie des entérobactéries:

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par E. C. Parham 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. [62 ] Bernard

Caractère biochimique :

#### 2.4.3.5 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).[63].

#### 2.4.3.6 Utilisation des cultures bactériennes pures :

la décoloration et la minéralisation des colorants azoïques par les souches bactérienne est plus rapides comparés au système de champignon, elle peut particulièrement utilisé des cultures mixtes, comme certain consortiums microbiens peuvent en commun effectuer des tâche de biodégradation,[64]

Cependant les cultures mixtes est un moyen de donné seulement une vue macroscopique ce qui se produit dans le système, et les résultats ne sont pas reproductibles, leur interprétation efficace est très difficile, 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.[65]

Le tableau 3.1 :

Type de colorant et concentration	Nom de la souche	Temps (h)	Type d'enzyme
Rouge réactive 22 (200–600mg/l)	<i>Pseudomonas luteola</i>	PD	Réduction [66]
Différents colorants azoïques de 10 à 100 mg/l	<i>Aeromonas hydrophila</i> var 24 B	24	Réduction [67]
Bleu réactive 13 à 200 mg/l	<i>Pseudomonas</i> sp.	70	PD [67]
Vert réactive 19 à 50 mg/l	<i>Micrococcus glutamicus</i> NCIM 2168	42	Oxydation et réduction [68]
Orange réactive 96 et rouge réactive 120	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> en anaérobie	2	Réduction [69]
Orange réactive 16 à 100 mg/l	<i>Bacillus</i> genus	24	Réduction [70]

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.[71, 72]

#### 2.4.3.7 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 (joshi et al 2008) [73], 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.[74, 75, 76]

Dans le consortium microbien, les souches isolées peuvent attaquer les molécules de colorant par différentes positions, ou peuvent aussi utiliser les métabolites produits par ces souches pour une autre décomposition. [77, 78, 79]

En générale au cours de la dégradation initiale de la liaison azoïque des colorants résulte à la production des amines aromatiques qui sont toxiques à la nature, cependant la présence du consortium microbien permet de les dégrader par des organismes complémentaires, ce processus est considéré utile et efficace. [80, 81,82]

Tableau 3.2 :

Type de colorant et concentration	Organisme utilisé	temps d'élimination	Type d'enzyme
Colorants azoïques	Bacillus cereus, Sphaerotilus natans, Arthrobacter sp., boues activées en anaérobie	PD	Réduction [65]wuhrman et al 1980
Orange acide 7 et rouge directe 254 de 60 à 300mg/l	Culture mixte en anaérobie	50 j	Réduction [83] bras et al 2001
Noir réactive 5 à 116 mg/l	Boues activées	30 minutes	Adsorption [84, 64] Gulnaz et al.2006 Nigam et al1996
Rouge de méthyle de 20 à 30 mg/l	Culture mixte	16 h	Réduction [85] adedayo et al 2004
Orange acide 7 de 30 à 60 mg/l	Culture mixte mutagène	140 h	[83]Bras et al 2001

PD : pas disponible.

#### 2.3.4.8 Le mécanisme de la biodégradation des colorants :

Les composés azoïques sont susceptibles à la dégradation biologique sous les conditions aérobies et anaérobies [74], 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 transfert de quatre électrons (réduction des équivalents), ceci est réalisé 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 [71].

les métabolites intermédiaires résultant (amines aromatiques) sont rapidement dégradés en conditions aérobie ou anaérobie [76, 85]

Certains 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 [86]

Il a été aussi rapporté que la décoloration en aérobie des colorants azoïques est un procédé avantageux ou le colorant azoïque peut agir comme un accepteur d'électrons [87,88], 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. [89] Sous les conditions d'aérobies les enzymes mono et di-oxygénase catalysent l'incorporation de l'oxygène, à partir d'O<sub>2</sub> vers les cycles aromatique des composés organiques avant la rupture des cycles.[90], certaines bactéries aérobies sont capables de réduire les composés azoïques à l'aide de l'oxygène catalysé par l'azo-réductase et produit les amines aromatiques [91], il a été aussi rapporté que l'azo-réductase en aérobie a pu utiliser 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. [92] , 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 [93], 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.

#### 2.3.4.9 Les 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. [94]

##### ➤ 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 à 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 [95], 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 à tendance à être réoxydé par l'oxygène moléculaire [96],

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 anaérobie de la liaison azoïque a eu lieu, l'équilibre aérobie anaérobie 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 anaérobie, ils sont spontanément instables, en présence d'oxygène cela aboutit à l'oxydation des groupes hydroxyles et aminés aux quinines aminées, les composés comme ceux-ci peuvent subir une polymérisation, menant au développement de nouveaux colorants chromophores obscurs qui est un sous-produit indésirable (nocif). [97]

➤ La 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. [98]

➤ Le 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 une augmentation du pH due à la formation les métabolites des amines aromatiques qui sont plus basiques que les composés azoïques originale. [99], le changement du pH dans une gamme de 7 à 9,5 à un très faible effet sur le processus de réduction des colorants,

Il à été trouvés que l'estimation du taux de réduction des colorants à augmenté près de 2,5 à un pH élevé de 5 à 7, tandis que ce taux devient insensible aux pH de gamme 7 à 9,5. [98]

➤ La 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 existé dans certain eaux usées, en effet la constante de la cinétique qui métrise l'efficacité de processus, en commun avec d'autre 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'assuré une efficacité au processus en incluant le chargement de la capacité de la biomasse ou la température opérationnelle nécessaire pour assuré l'élimination du colorant à une efficacité donné dont les contraintes déterminé par le volume du réacteurs disponible, la composition de la solution de base et les débits.

WUHRMAN à observé que après une réduction initial et rapide de colorant, le taux d'élimination de colorant à diminué plus rapidement que serait prévu par

une réaction du premier ordre [65]. 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 $\mu$ M ont été facilement décolorés, mais quand la solution du colorant a été augmentée à 30  $\mu$ M, l'élimination du colorant a été réduite [100].

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. [102]

➤ structure de colorant :

Quelques colorants azoïques sont plus résistants à la dégradation par les cellules bactériennes [102], les colorants avec des structures simples et de faible poids moléculaire présentent des taux de dégradation élevés, tandis que les colorants très substitués et de poids moléculaire élevés leur dégradation est plus difficile. [100]

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 (-SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) en position para des cycles phényles reliés à la liaison azoïque, cause une augmentation du taux de réduction [103].

NIGAM et AL ont établi que les composés azoïques liés avec un groupe hydroxyle ou amine sont susceptibles d'être dégradés que ceux liés avec le méthyle, méthoxy, sulfoné ou les groupes nitro [64].

L'élimination de la couleur est aussi liée au nombre de liaisons azoïques 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 [104]

Un nombre de chercheur à corrélé le niveau de taux d'élimination avec la classe du colorant plutôt qu'avec les caractéristiques moléculaires [105].

HITZ à conclu que :

- ✓ les colorants acides, ont un taux d'élimination faible à cause aux nombres des groupes sulfoné dans les colorants.
- ✓ les colorants directs, ont un taux d'élimination élevé qui est indépendant du nombre de groupe sulfoné dans le colorant.
- ✓ Les colorants réactives, ont un taux d'élimination faible [106].

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

KULA à 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 à 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 [107].

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 d milieu entourant la molécule.

➤ 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 à montré que l'addition de l'électron donneur comme le glucose ou des ions acétates, stimule la coupure de la liaison azoïque par réduction [102].

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 [108], 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.[109]

➤ Le 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 [110], 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. [101]

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 générés pendant le processus de réduction [111].

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 augmente [87].

➤ L'intermédiaire d'oxydo-réduction :

Comme il est peu probable que les colorants très chargés en sulfate passeront à travers la membrane cellulaire, la réaction de réduction des colorants doit impliquer la réduction de l'activité cellulaire [112], cette activité de réduction est réalisée en utilisant des composés intermédiaires d'oxydoréduction, comme les flavines qui transportent les échanges de réduction à partir des cellules pour faciliter la réduction non-enzymatique extracellulaire de colorant azoïque [109]. 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 [113], l'ajout des électrons synthétiques entraîne 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 [112]. Le quinone transfère 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.[114], ce hydroquinone est ensuite oxydé par le colorant dans une réaction chimique directe [108], l'application des quinones naturels biodégradables comme Lawsonie, qui est une technique qui a 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 [114].

## CHAPITRE 4 : MATERIELS ET METHODES

### 4.1 Introduction :

La biodégradation du MO par des bactéries d'origine végétale nécessite la présence de matériel consommable, ainsi que des appareils pour l'analyse des produits dégradés.

### 4.2 Matériels et produits :

#### 4.2.1. Tableau du Matériels :

Appareil	Marque
Microscope photonique	Motic
Centrifugeuse	Hettich EBA
Autoclave verticale	WOLF
Spectrophotomètre UV visible	Shimadzu
Chromatographe liquide à haute performance	Shimadzu
pH mètre	Hanna
Etuve microbiologique	Binder

#### 4.2.2. Tableau des Produits :

Produit	Paramètre
Gélose nutritive	Idéal labo à conserver entre (2-8°C)
Gélose nutritive inclinée	Gélose inclinée dans des tubes à essais stérilisés
Gélose héктоen	Institut Pasteur d'Algérie (250 ml)
Milieu nutritif et d'enrichissement	Milieu minimum (MM)
Méthyle orange	Panreac
Galerie API 20 E	bioMérieux SA

### 4.3 Méthodes expérimentales :

#### 4.3.1 Préparation de la solution de colorant naturel par l'extrait de betterave :

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.



Photos 4.1 : préparation de l'extrait de betterave

#### 4.3.2. Préparation de l'échantillon :

L'échantillon préparé, permet de suivre la biodégradation de colorant utilisé et la préparation de la biomasse bactérienne, le rapport (jus de betterave/colorant=1), l'échantillon est filtré avec le papier filtre, stérilisé pour éviter toute contamination.

#### 4.3.3. Préparation de la biomasse bactérienne :

Après avoir laver, sécher et stériliser tout le matériel à utiliser, sur une paillasse 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 5000tours/minutes pendant 20 minutes. Le surnagent est éliminé en récupérant le culot (la biomasse) au fond du tube.



Photos 4.2 : récupération de la biomasse bactérienne

#### 4.3.4. 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 24 h.

#### 4.3.5. 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.

#### 4.3.6. 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 choisi des colonies isolées de morphologie différentes, en suivant les même étapes précédentes.

#### 4.3.7. La sélection des souches :

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

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

##### 4.3.7.1. 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.
- Décolorer en tenant la lame inclinée et en faisant couler du décolorant jusqu'à ce que celui-ci apparaisse incolore à la partie inférieure du frottis.
- Laver à l'eau, égoutter, sécher sur papier- filtre.

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. [116]

#### 4.3.7.2. Tests biochimiques classiques :

Grace à ces tests il est possible de connaitre 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 ya formation d'un acide a 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 API 20 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, a la suite d'une période d'incubation (24 h à 37° C) 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.

#### 4.3.8. Etude la cinétique de la biodégradation du MO :

Après isolement, purification et identification des souches bactériennes issues de l'extrait de la betterave rouge, il est important de sélectionner laquelle qui à la meilleure performance en cinétique de biodégradation, Pour se faire, un colorant azoïque model à été choisi.

Les essais sont effectués avec des cultures jeunes des bactéries sélectionnées dans un milieu minimum enrichi avec des sels minéraux et des substances nutritives à une valeur énergétique par le peptone et le saccharose (pour avoir une source Carbone) obtenues après 24 heures d'incubation.

- Les échantillons sont préparés avec une solution de (MO+milieu d'enrichissement) à une concentration de 40 mg/l de MO.
- Le mélange est versé dans 12 tubes à essais stérilisées. Dans chaque tube une souche pure est introduite dont 02 tubes sont témoins, 06 tubes sont incubées à 37°C dans une étuve bactériologique, tan disque les 06 autres tubes sont maintenues à la température ambiante 25°C dans les conditions aérobie-anaérobie facultatif pendant 10 jours.

##### 4.3.8.1. Mesure de l'absorbance par Analyse spectrophotométrique UV-vis :

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 40 mg/L ; les solutions des colorants obéissent à la loi de Berr-Lambert. Pour mesurer la concentration en colorant, il suffit de prélever un échantillon du surnageant après centrifugation de 5000tr/min pendant 20 minutes à l'aide d'une centrifugeuse.

#### 4.3.8.2 Chromatographies en phase liquide :

Cette méthode permet de suivre la biodégradation du colorant MO en fonction du temps, a deux températures différentes 25 et 37°C avec un débit de 0,7 20 minutes, la phase mobile utilisée est  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{COOH})/27/71(2\%)$ .

## CHAPITRE 5 : RESULTATS ET DISCUSSION

### 5.1 Cinétique de la biodégradation du méthyle orange par le consortium bactérien:

#### 5.1.1 Influence de la température :

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 3 de l'annexe B. Les taux de dégradation du méthyle orange par le consortium de l'extrait de betterave rouge en fonction du temps aux températures 37 et 25 °C sont décrits par la figure 5.1 :

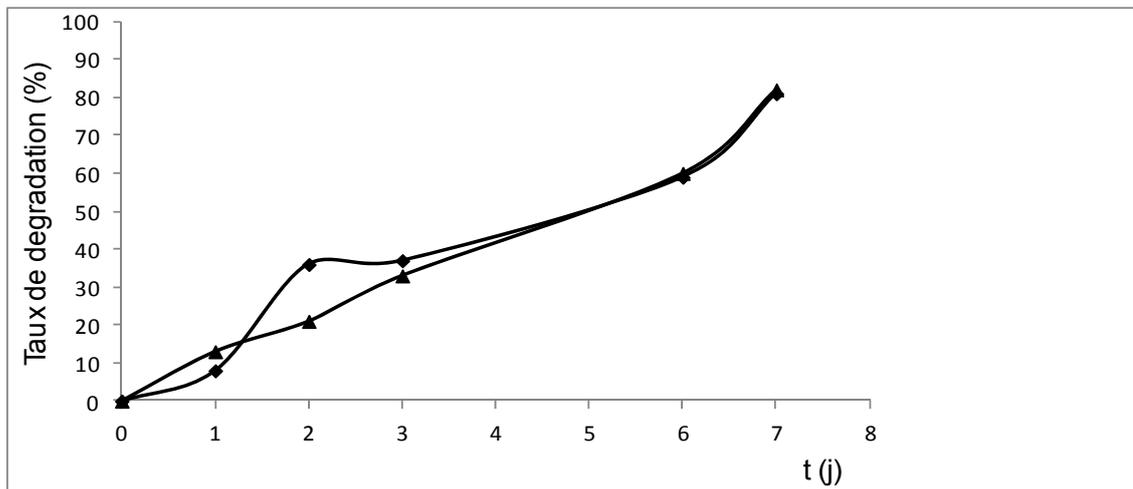


Figure 5.1 : Taux d'élimination du MO dans l'extrait de betterave en fonction du temps : 25°C (▲) et 37°C(◆).

La figure 5.1 montre qu'après 7 jours d'incubation le taux de dégradation atteint son maximum 82 % aux températures 25 et 37 °C, exceptionnellement aux 2<sup>ème</sup> jours d'incubation le taux de dégradation atteint 21% à 25 °C, et 31% à 37°C, de cela on déduit qu'il ya un autre paramètre qui influe sur le taux de biodégradation qui est le rapport entre la biomasse et le substrat présent dans l'extrait de betterave et son affinité.

De ces résultats, on peut supposés que les bactéries présentes dans l'extrait de betterave sont mésophiles. Leur température optimum est entre 25 et 45 °C.

### 5.1.1.1 Mesure de l'absorbance du MO dans l'extrait de betterave à 25 et 37°C :

Un balayage à été effectué de  $\lambda = 350$  à  $800$  nm

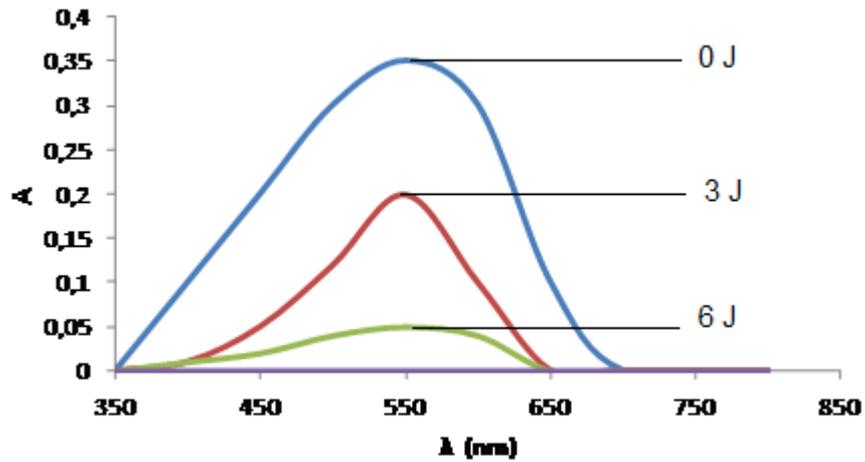


Figure 5.2 : Variation de l'absorbance du MO dans l'extrait de betterave à 25 °C

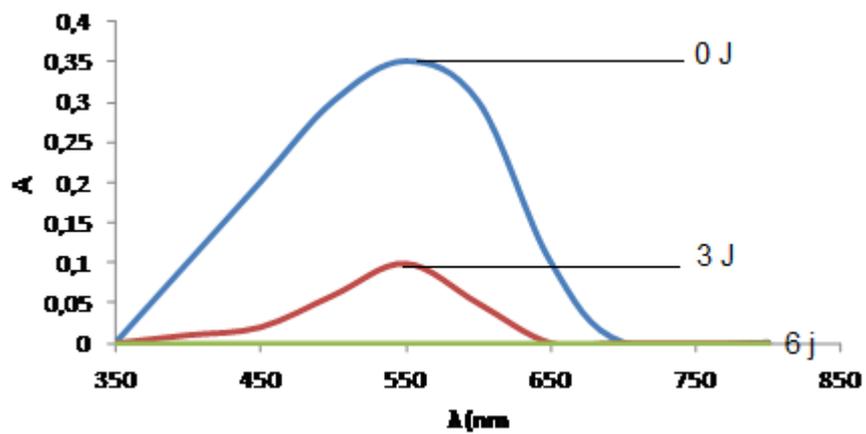


Figure 5.3 : Variation de l'absorbance du MO dans l'extrait de betterave à 37 °C.

La figure 5.2 indique que la biodégradation du MO dans l'extrait de betterave par le consortium atteint son maximum, 100% après 6 jours d'incubation à la température de 37°C.

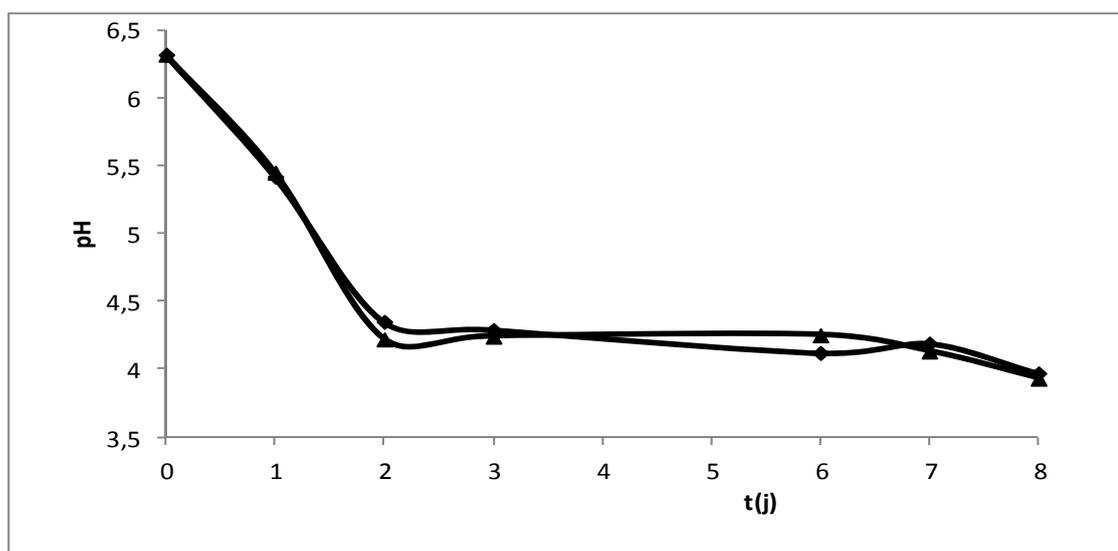
La figure 5.3 indique que la biodégradation du MO dans l'extrait de betterave par le consortium atteint son maximum, 100% après 8 jours d'incubation à la température 25°C.

D'après les résultats des deux figures 5.2 et 5.3 la température estimé optimale de la biodégradation est de 37 °C après 06 jours d'incubation.

D'autre part selon les travaux concluent que Pour avoir un taux maximal d'élimination du colorant, la température exigée tend à correspondre à la température optimale de la croissance des cultures cellulaire de 35°C à 45°C. [99]

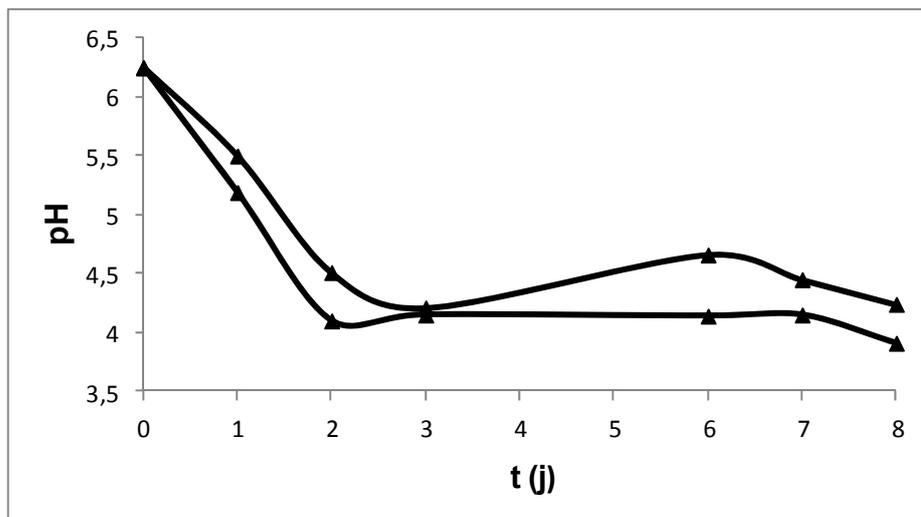
#### 5.1.2 Suivi du pH :

Pour déterminer le pH optimum de la biodégradation, une étude comparative à été réalisée entre l'évolution du pH au cours de la cinétique de biodégradation du MO dans l'extrait de betterave, et les colorants naturels présents dans l'extrait de betterave, aux températures 25°C et 37°C a été effectué. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 4 de l'annexe B.



**Figure 5.4 : Variation du pH au cours de la biodégradation du MO en fonction du temps aux températures : (▲) 25°C et (◆) 37°C.**

La figure 5.4 indique que la variation la plus considérable du pH est visible durant les 02 premiers jours d'incubation, où le pH chute de 6,32 aux environs de 4, cela signifie qu'il y a des composés métabolites qui correspondent à la biodégradation du MO dans l'extrait de betterave, la suite du temps jusqu'aux 8<sup>eme</sup> jours d'incubation, le pH reste sensiblement constant, aux températures 25°C et 37°C.



**Figure 5.5 : Variation du pH au cours de la biodégradation de l'extrait de betterave en fonction du temps : (▲) 25°C et (■) 37°C**

La figure 5.5 indique que le pH diminue de 6,25 aux environs de 4 pendant 02 jours d'incubation, cela signifie que les colorants naturels de l'extrait de betterave sont dégradés donnant des nouveaux composés métabolites, Par contre le pH reste constant après 8 jours d'incubation, donc il existe des microorganismes dans la betterave qui sont responsables de la biodégradation du colorant.

D'après les deux Figures 5.4 et 5.5, Il apparaît qu'il y a une similitude entre les deux courbes : la variation du pH au cours de la biodégradation du MO dans l'extrait de betterave, et la variation du pH au cours de la biodégradation du colorant naturel de l'extrait de betterave, de cela il est à noter que les colorants qui existent dans l'extrait de betterave sont similaire au colorant azoïque MO, et le pH optimum de la biodégradation est aux environs de 4.

De ces résultats on peut conclure que ces bactéries sont des Lactobacilles, leur pH optimum est de 4.

Pour maîtriser et comprendre le mécanisme réactionnel de la biodégradation des colorants, des souches bactérienne ont été isolées et identifiées de l'extrait de betterave et un colorant azoïque le (menthyle orange) a été choisi.

## 5.2 Isolement, sélection et purification des souches bactériennes :

### 5.2.1 Examen direct à l'état frais :

Après 24h d'incubation, la lecture à l'œil nu des boites de pétri sur gélose, nutritive et héктоen distingue 4 types de colonies différentes selon leur morphologies (consistance, taille, couleur, et forme).

Les photos 5.1 à 4 montrent les morphologies des souches sur gélose nutritive :



Photos 5.1: S<sub>1</sub> sur GN



Photos 5.2 : S<sub>2</sub> sur GN



Photos 5.3 : S<sub>3</sub> sur GN



Photos 5.4 : S<sub>4</sub> sur GN

Le tableau 5.1 récapitule les caractéristiques morphologiques de ces quatre souches :

Tableau 5.1 : Paramètres morphologiques des souches bactériennes

Examen	Paramètre	Souche 1	Souche 2	Souche3	Souche 4
Morphologie des colonies sur Hektoen	Consistance	Grasse (brillante)	Sèche (opaque)	Glaireuse	Grasse brillante
	Taille	Très fine	Moyenne	Très fine	Très fine
	Couleur	Crème	Crème	Rose pâle	Crème
	Forme	Arrondie bombée	Circulaire irrégulière plate à dépression centrale	Circulaire arrondie bombée	Circulaire arrondie bombée

Les photos 5.5 à 8 montrent les morphologies des souches sur gélose héktoen.

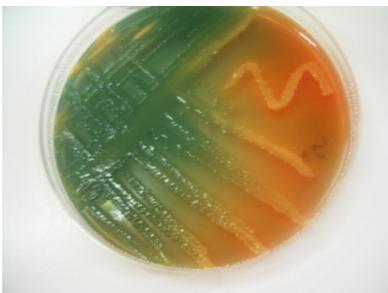


Photo 5.5: S<sub>1</sub> sur hektoen

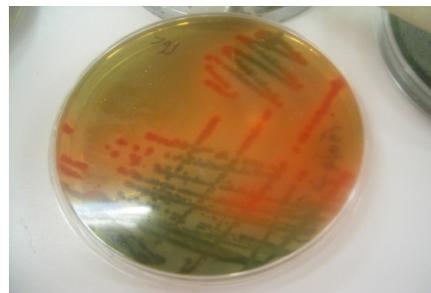


photo 5.6: S<sub>2</sub> sur hektoen



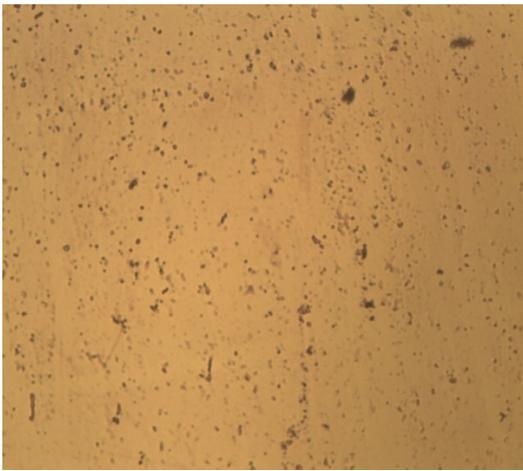
Photo 5.7: S<sub>3</sub> sur hektoen



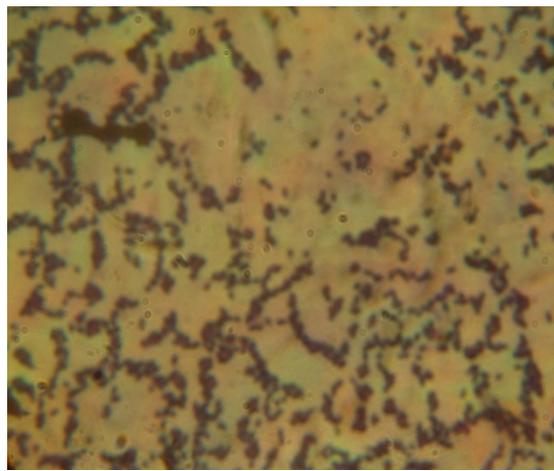
photo 5.8 : S<sub>4</sub> sur hektoen

### 5.2.2 Coloration de gram et examen sous microscope :

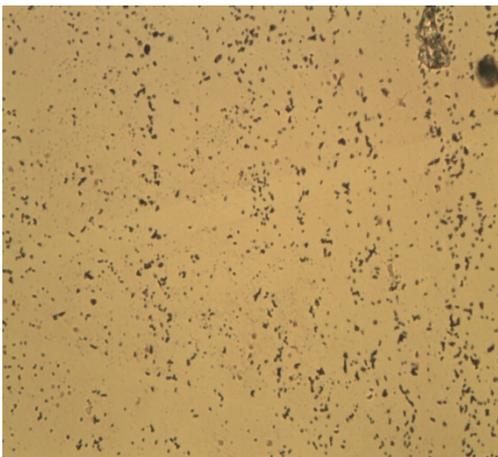
Après la décoloration à l'alcool, les trois souches : souche 1, souche2, souche4 sont colorées en rose, donc c'est des (gram-) par contre la souche 3 et de couleur violet, donc c'est une (gram+), elle appartient aux bacilles à **gram positifs**.les photos ci-dessous réaliser avec un microscope photonique d'agrandissement x 100 mettent en évidence ceci :



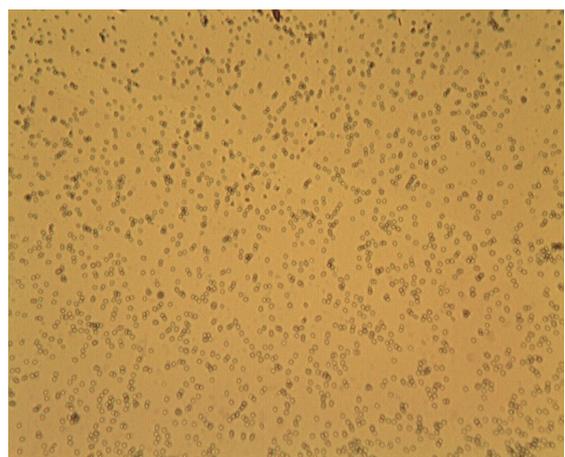
Photos 5.9 : S<sub>1</sub> sous microscope



photos 5.10 : S<sub>2</sub> sous microscope



Photos 5.11: S<sub>3</sub> sous microscope



photos 5.12 : S<sub>4</sub> sous microscope

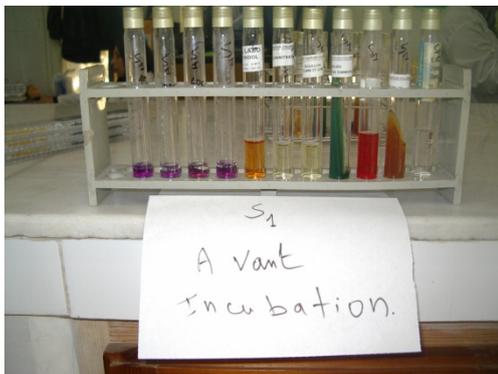
Tableau 5.2 : résultat de la coloration de gram et l'examen microscopique.

Examen	Paramètre	Souche1	Souche2	Souche3	Souche4
Gram	Coloration	Gram -	Gram -	Gram +	Gram -
Sous microscope	Mobilité	+	+	+	+
	agencement	Coccobacille	coccobacille	Bacillus	coccobacille

### 5.3 Identification des souches bactériennes :

#### 5.3.1 Identification par La galerie biochimique classique:

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

Photos 5.13 : S<sub>1</sub> avant incubationPhotos 5.14 : S<sub>1</sub> après incubationPhotos 5.15: S<sub>2</sub> avant incubationPhotos 5.16: S<sub>2</sub> après incubation



Photos 5.17 : S<sub>3</sub> avant incubation



photos 5.18: S<sub>3</sub> après incubation



Photos 5.19 : S<sub>4</sub> avant incubation



photos 5.20 : S<sub>4</sub> après incubation

Les résultats des 23 tests biochimiques suivis pour les quatre bactéries ainsi que les résultats du type enzyme respiratoire sont rassemblés dans le tableau 5.3

Tableau 5.3. : Résultats de la galerie biochimique classique

Réactif	Le caractère	souche1	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 <sub>2</sub> S	-	-	-	-
Mannitol/Mobilité	Mannitol	+	+	-	+
	Mobilité	+	+	+	+
Urée/Indole	Uréase	-	-	-	-
	Indole	-	-	-	-
	T.D.A	-	-	-	-
Disque ONPG	ONPG	+	-	-	+
Clarck et Lubs	RM	+	-	-	+
	VP	-	+	-	+
Nitrate	Nitrate réductase	+	-	-	-
	Nitrite réductase	-	+	+	+
Citrate de Simmons	Utilisation des citrates	-	-	-	+
Témoin		-	-	-	-
ODC		+	-	-	+
LDC		-	-	-	+
ADH		+	-	-	+

### 5.3.1.1 Synthèse des résultats :

D'après les tests précédents, les trois souches 1, 2 et 4 sont de gram(–) et elles jouissent des caractères biochimiques suivants :

- Oxydase (-)
- Catalase (+)
- Mobilité(+)
- et fermentent le D-glucose.

Ces caractères biochimiques permettent de classés ces trois souches dans la famille des **Entérobactéries**.

Par contre la souche 3 qui à un gram (+)

- Oxydase (+).
- Catalase (+).
- et ne fermentent pas le D-glucose donc elle appartient a la famille des bacillaceae.

### 5.3.2 Identification par la galerie API 20 E :

Bien que la galerie biochimique classique à mis en évidence quelque tests biochimique qui a classer ces souches par leur famille, il reste d'autre tests qu'on peut les réalisé par la galerie API 20 E, et cela pour déterminer le genre et l'espèce le tableau 5.4 regroupe tout les résultats des tests.



Photos 5.21 : Api 20E avant incubation    photos 5.22 : Api 20 E après incubation

Tableau 5.4 : Lecture des résultats de la galerie API 20 E :

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 <sub>2</sub> 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	+	-	-	+

### 5.3.2.1 Lecture des résultats :

Le traitement numérique avec logiciel spécifique permet d'obtenir la classification systématique des bactéries étudiées.

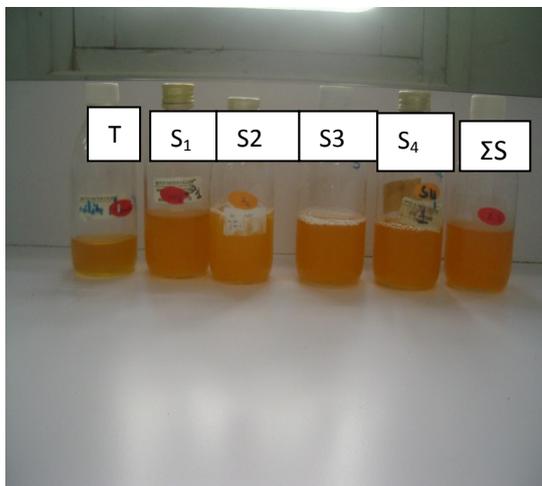
La souche 3 ne répond pas aux caractères biochimiques de L'API 20 E, il est nécessaire d'utiliser une API spécifique pour les bacilles à gram positifs.

Tableau 5.5 : 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 4	Entérobactériaceae	Entérobacter	aerogenes

#### 5.4 Utilisation des souches bactériennes à la biodégradation du MO :

Après l'identification des souches bactérienne, chaque souche pure à été testée pour déterminer sa capacité à la biodégradation du MO aux températures 25°C et 37°C, ainsi que le consortium et cela pour déterminées le mode d'interaction entre les bactéries.

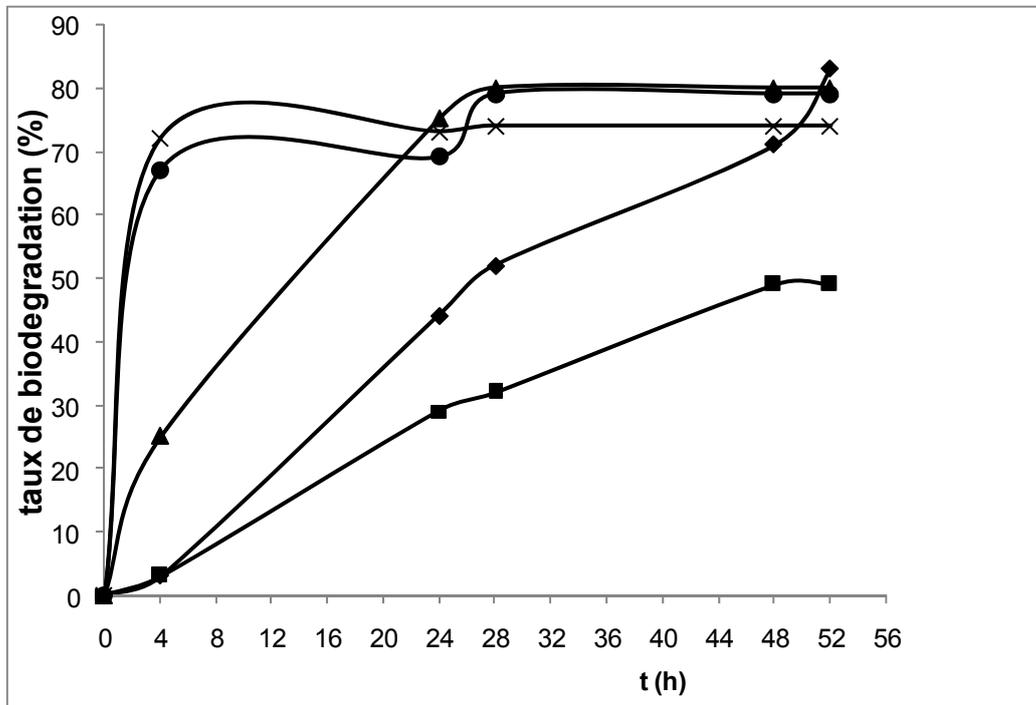


MO avec les différentes souches t=0h  
(Avant incubation)



MO avec les différentes souches t=24h  
(Après incubation)

Les tableaux des résultats du graphe sont regroupés en annexe B, tableau 13 et 14.



**Figure 5.6 : Taux d'élimination du MO à 25°C : S<sub>1</sub>(◆), S<sub>2</sub> (■), S<sub>3</sub>(x), S<sub>4</sub>(▲) et ΣS(●)**

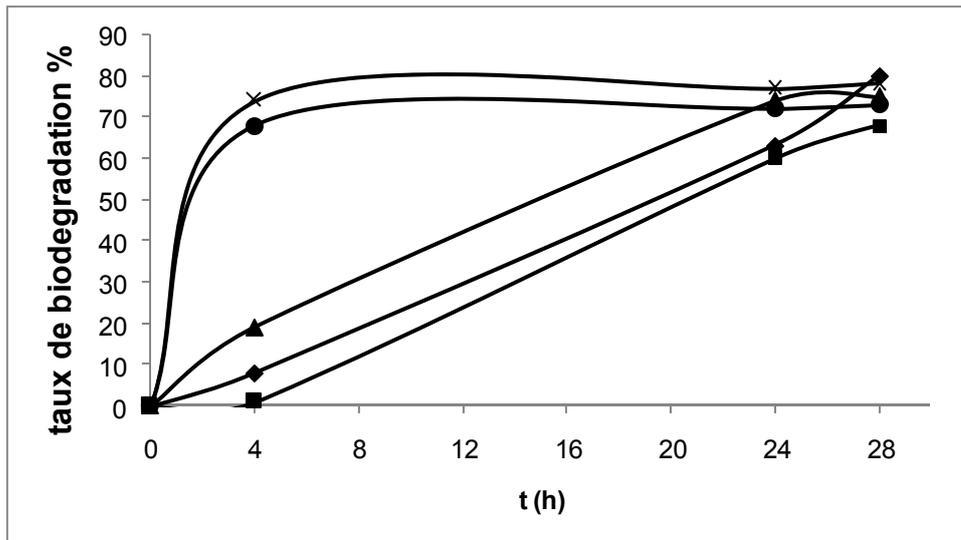
La figure 5.7 montre qu'après 04 heures d'incubation le taux de biodegradation de la souche 3 et le consortium atteint respectivement 67 % et 72 %, cette phase correspond à la phase d'accélération, La multiplication bactérienne s'effectue à un taux de croissance  $\mu$  constant.

Après 52 h 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 a la phase exponentiel. [62]

La souche 4 atteint 80 % après 28 heures d'incubation, c'est la phase d'accélération puis reste constante après 52 heures d'incubation cela est relatif à la phase exponentiel.

La souche 2 atteint son maximum 49 % après 28 heures.

La souche 1 atteint son maximum 83 % après 52 heures.



**Figure 5.7 : Taux d'élimination du MO à 37°C : S<sub>1</sub>(♦), S<sub>2</sub> (■), S<sub>3</sub>(x), S<sub>4</sub>(▲) et ΣS(●)**

La figure 5.8 est similaire de la figure 5.7, elle indique qu'après 04 heures d'incubation le taux de biodégradation de la souche 3 et le consortium atteint respectivement 74 % et 68 %, c'est un taux plus élevé qui correspond à la phase d'accélération, puis reste sensiblement constant après 28 h d'incubation c'est la phase exponentiel.

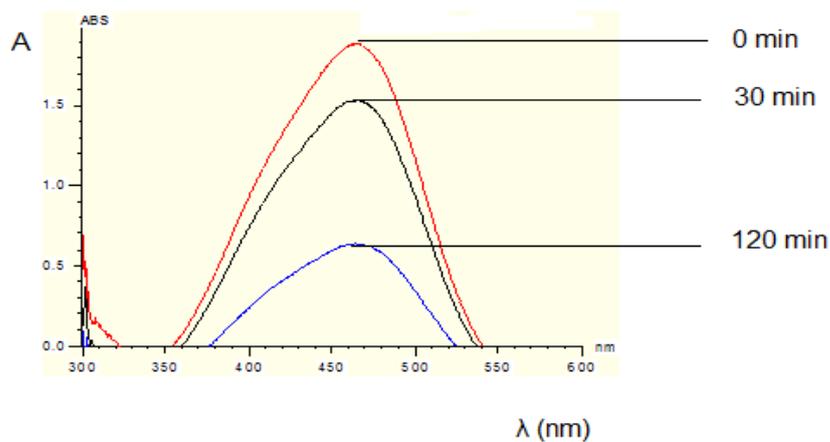
Les souches 1,2 et 4 atteint 8 %, 1 % et 19 % après quatre heures puis augmente lentement et devient après 28 heures 80 %, 68 % et 75 % et reste contant.

D' après les deux figures, 5.7 et 5.8 les résultats nous indiquent que le meilleur taux de biodégradation du MO est par la souche 3 et le consortium à la température optimale 37°C, et l'estimation du rapport substrat biomasse influence aussi sur le taux de biodégradation, cependant les résultats de biodégradation par le consortium ne sont pas reproductibles, leur interprétation efficace est très difficile, 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 [72,73]

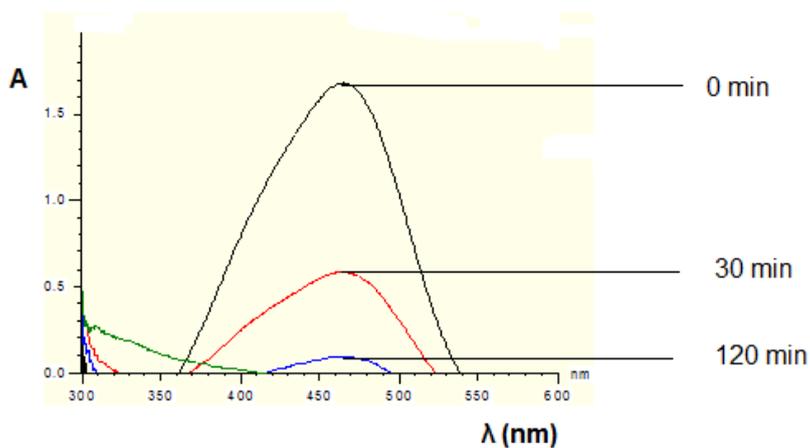
#### 5.4.1 mesure de l'absorbance et le taux de biodégradation du MO par a souche 3 :

##### ➤ Mesure de l'absorbance

La souche 3 à été sélectionnée la meilleur souche qui à donnée un taux maximal de biodégradation du MO, une mesure de l'absorbance aux températures 25°C et 37 °C à été effectuer pour confirmer ces résultats.



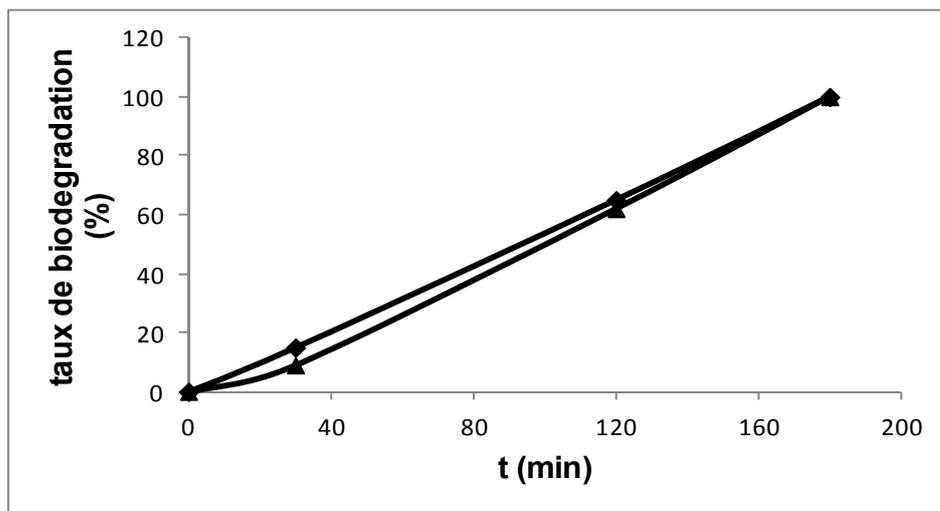
**Figure 5.8 Mesure de l'absorbance du MO a par la souche 3 à T (25°C)**



**Figure 5.9 : Mesure de l'absorbance du MO par la souche 3 à T (37°C)**

D'après les résultats des deux figures 5.10 et 5.9 indiquent qu'après 120 minutes d'incubation à 37 °C la DO diminue de 1,68 à 0,20 et de 1,68 à 0,60 à 25 °C, donc la température optimale est celle de 37 °C ce qui confirme les résultats précédents.

➤ Mesure du taux d'élimination du MO



**Figure 5.10 : Taux d'élimination du MO par S3 en fonction du temps aux températures 25°C(▲) et 37°C (■)**

La figure 5.11 indique qu'après 180 minutes d'incubation le taux de dégradation à 25°C, 37° du MO par S3 atteint respectivement 100 %.

L'intervalle de 0 à 180 min de biodégradation est très court, donc on ne peut pas distinguer les différentes phases de la croissance bactérienne.

#### 5.4.2 Etude analytique par chromatographie en phase liquide de la biodégradation du MO par la souche 3 :

Cette méthode permet de déterminé le mécanisme de la biodégradation du MO et ses produits intermédiaire par la souche 3, aux températures 25°C et 37°C.

A partir de la courbe d'étalonnage du MO à différente concentrations on à déterminer le taux d'élimination en fonction du temps aux températures : 25°C et 37 °C.

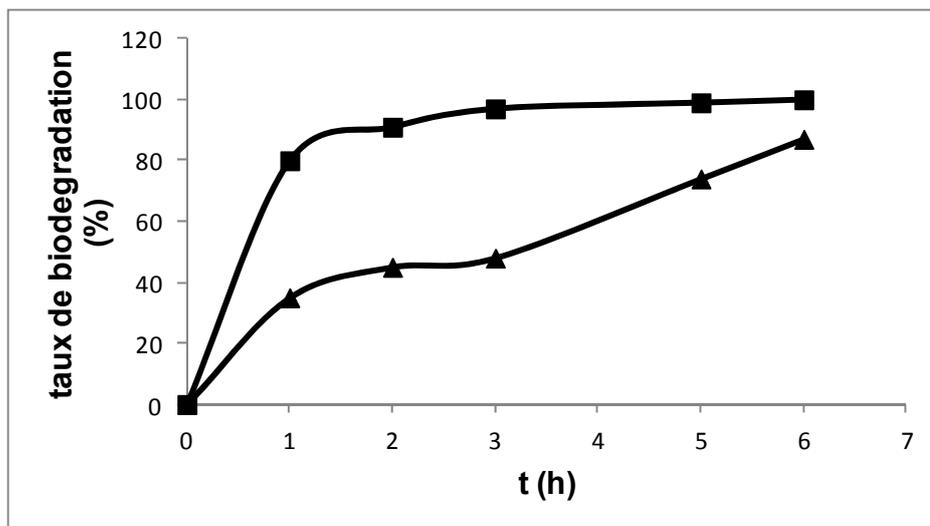


Figure 5.11 : le taux d'élimination du MO par S3 à 25°C(▲) et 37°C (■).

La figure 5.11 indique que la première phase de 0h à 1h, elle est caractérisée par une augmentation rapide du taux de dégradation qui atteint 35 % et 80 %. Aux températures 25°C, 37°C respectivement, elle correspond à la phase d'accélération.

La deuxième phase de 1h à 6h, elle est caractérisée par une augmentation lente du taux de dégradation qui atteint à 25°C, 37°C respectivement 87% et 100%, elle correspond à la phase exponentiel, cela est dû à l'épuisement des éléments nutritif.

Cette analyse permet de noter que la biodégradation est influencée par deux paramètres : la température 37°C c'est la température favorable, et le rapport substrat biomasse.

Les résultats de l'analyse par HPLC, on remarque que durant tout le temps de 0 h jusqu'à 6 h il apparait un seul pic celle du MO, ce qui amène de dire que les composés métabolites secondaire n'apparait pas.

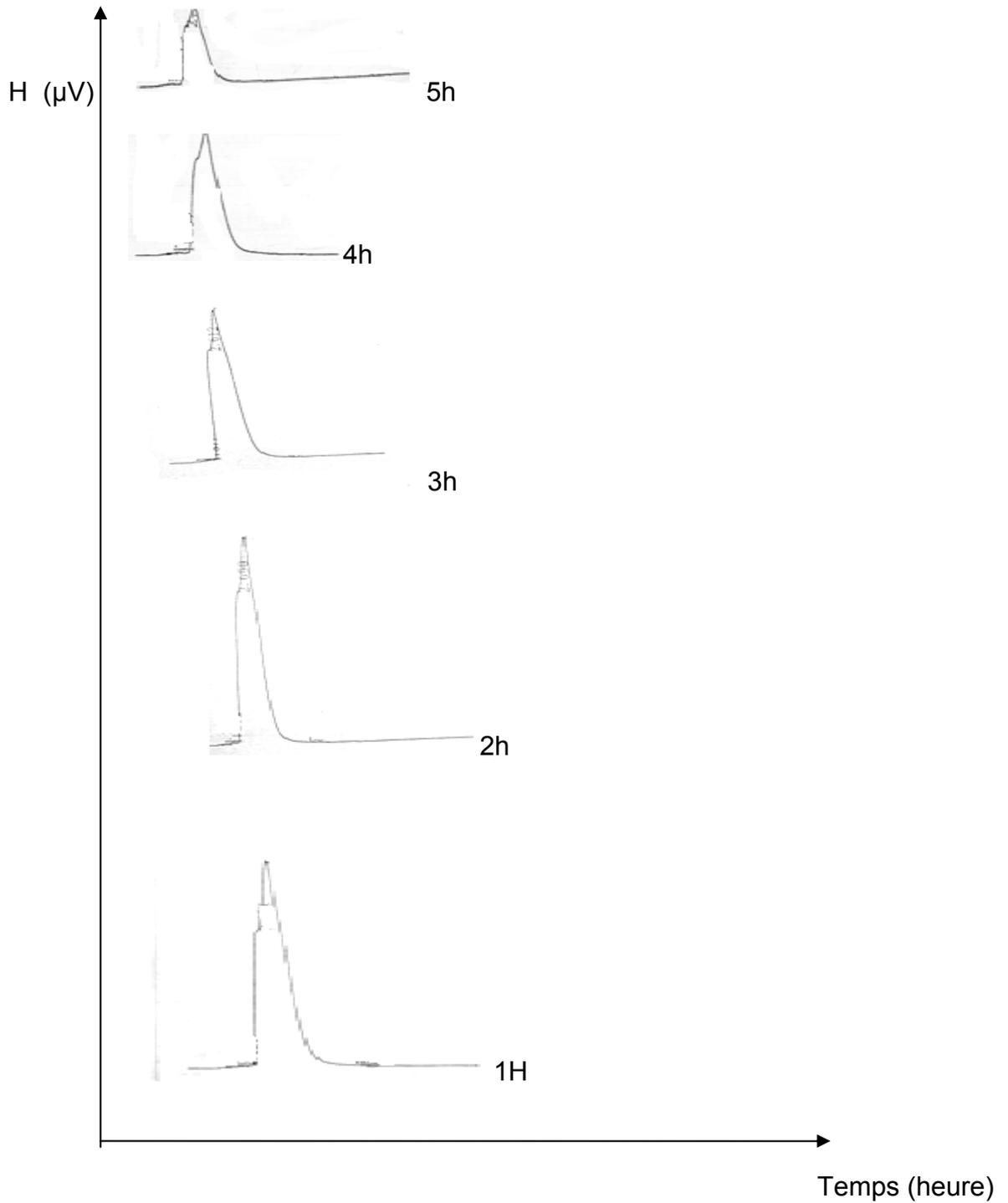


Figure : 5.12 les pics Analysés par HPLC à 25 °C

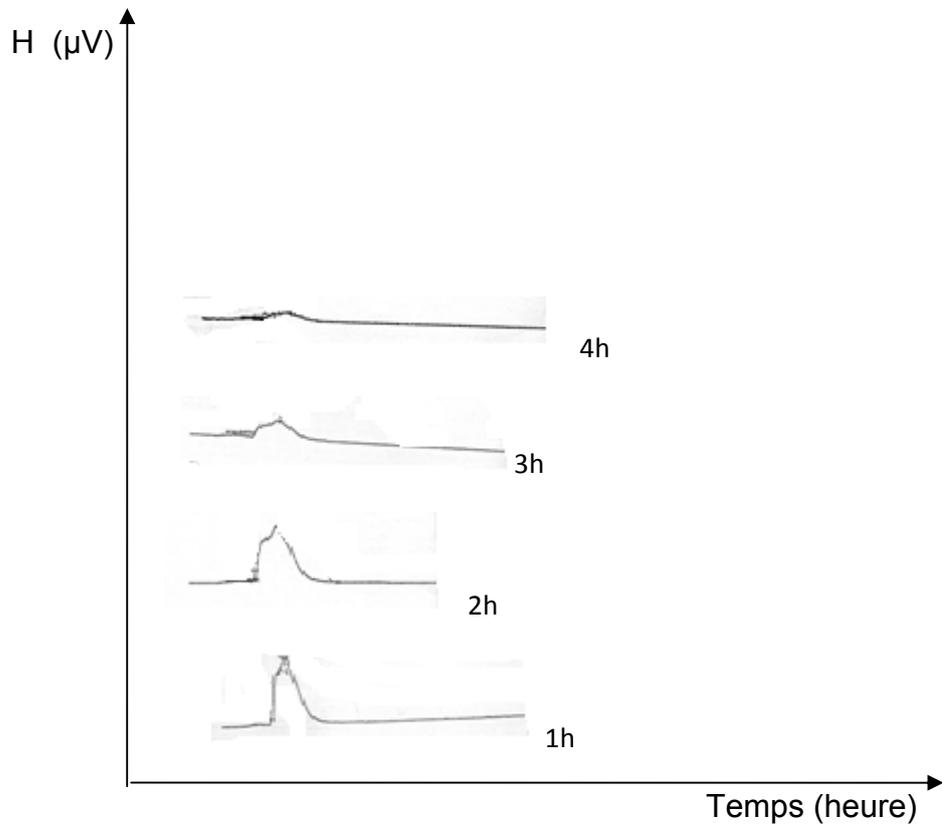


Figure 5.13 : les pics Analysés par HPLC à 37 °C

## Conclusion

L'élimination des molécules récalcitrante des eaux par le procédé de biodégradation par des bactéries, confirme la classification de ce procédé dans le contexte d'énergie renouvelable et les techniques vertes et propre.

Un taux d'élimination du méthyle orange à une concentration initiale 40 mg/l atteint 82 % pendant une durée de 7 jours par un consortium bactérien issue de la betterave rouge.

L'étude de la variation du pH et la température indique qu'ils sont indépendants de la biodégradation.

La durée de la biodégradation à été nettement améliorée par l'isolement et la purification des souches bactérienne dans un milieu minimum enrichi.

La sélection des bactéries à permis de mettre en évidence la présence de 04 souches bactérienne, parmi lesquelles 03 souches appartiennent à la famille des Enterobactérieae, ce sont des bacilles à gram (-), et une souche est bacille à gram (+).

Les 04 souches pure et mixte, sont inoculées avec le MO dans un milieu enrichie ont respectivement montré une nette amélioration du taux et la durée d'élimination du MO, qui passe de 08 jours à 1h et atteint 80 % pour la souche 3 qui à été sélectionnée la plus performante, ces résultats obtenus confirme l'efficacité du procédé.

L'analyse des résidus de la biodégradation par mesure du pH et des métabolites par HPLC confirme l'efficacité du procédé.

En perspective, ces résultats peuvent être améliorée par l'identification des bactéries par PCR, l'estimation du rapport substrat/biomasse, et l'utilisation de ces bactéries pour d'autre classe et colorants azoïques.

# ANNEXE A

## 1-Le méthyle orange :

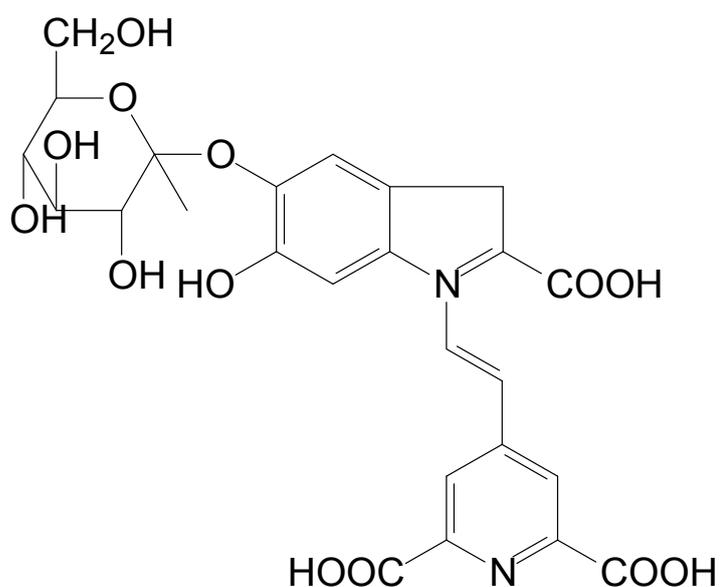
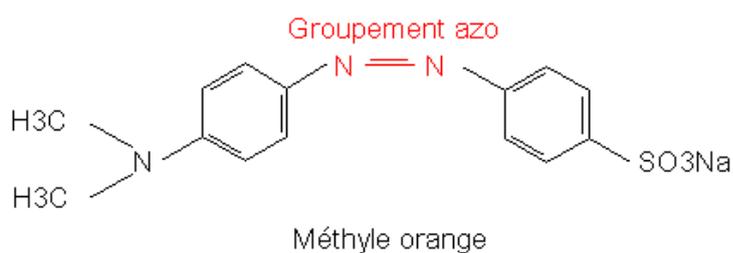
**Nom systématique :** *para*-(*para*-diméthylamino phénylazo)-benzène sulfonate de sodium ;

**Noms usuels :** Hélianthine B, Orange III ou Tropeolin D ;

**Code dans le Color Index :** C.I. 13025 ;

**Formule brute :**  $C_{14}H_{14}O_3N_3SNa$  ;

## Structure chimique :



**Structure du colorant betalaine de la betterave rouge.**

## **2-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- Milieu Hektoen :**

La gélose hektoen est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries à partir des prélèvements les plus divers, sa composition en (g/l) :

Peptone de farine de soja : 5

Peptone de viande : 2,5

Peptone de caséine tryptique : 2,5

Extrait de levure : 5

Extrait de viande : 5

Lactose : 5

Acide ascorbique : 0,5

Glycérophosphate de sodium : 19

Sulfate de magnésium : 0,25

Agar : 20

#### **d- 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.

Saccharose: 9g/l.

#### **3-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).

#### **4-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 9 ml 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 9 ml de l'eau physiologique stérile pour avoir une dilution de  $10^{-2}$ .
- Ainsi de suite jusqu'à avoir une dilution de  $10^{-9}$ .



Photos : la biomasse bactérienne

## **5-Les méthodes d'identification des bactéries :**

### **5-1 l'identification des souches par la galerie biochimique classique :**



#### **5.1.1 Recherche du type respiratoire :**

Le but de ce test, est de savoir si la bactérie est aérobie stricte, anaérobie ou aérobie 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'O<sub>2</sub>) 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 O<sub>2</sub>.

- refroidir à l'eau courante,
- on met ensuite le tube à l'étuve (à 37°C) pendant 24 heures

### **Résultats :**

Type aérobie strict : culture seulement en présence de dioxygène.

Type aéro-anaérobie : 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-anaérobie.

Type anaérobie strict : culture uniquement en l'absence de dioxygène.

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

### **5.1.2 Recherche de l'enzyme respiratoire :**

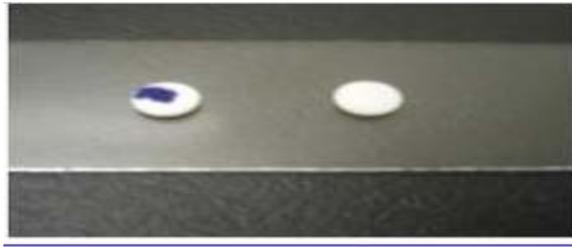
#### **a)- oxydase :**

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

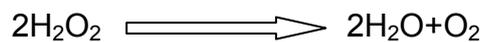
Si le disque est coloré en violet, donc cette bactérie possède l'enzyme oxydase, c'est une oxydase positif, par contre si le disque n'est pas coloré c'est une oxydase négatif.



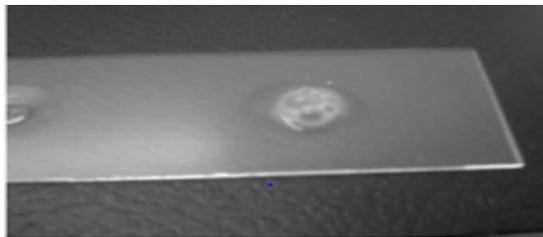
Test d'oxydase

### **b)-catalase :**

L'utilisation de l'eau oxygénée  $H_2O_2$  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



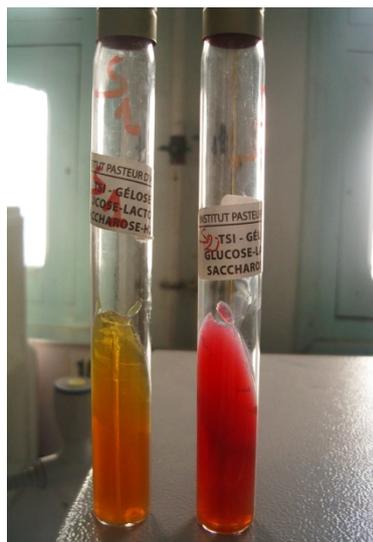
Test de catalase

### **5.1.3 Milieu TSI :**

Le milieu de Kligler-Hajna ou milieu lactose-glucose- $H_2S$  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 y a virage de la pente au jaune
- Le milieu peut être coloré en noir de façon plus ou moins intense par production d' $H_2S$
- La présence de gaz est détectée par la mise en évidence de bulles ou le soulèvement de la gélose



Après incubation      Avant incubation

#### 5.1.4 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,  $KNO_3$  et Rouge de phénol.

### Mode d'ensemencement :

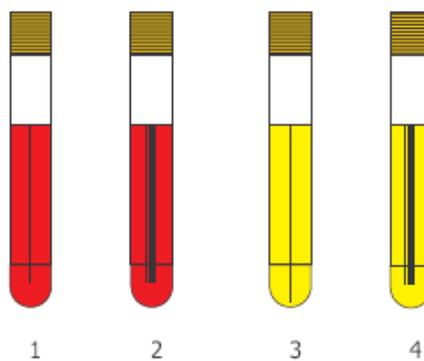
Ensemencer par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit. Incuber 24 h à 37 °C  
Remarque : ce milieu est utilisable uniquement pour les bactéries fermentatives.

### Caractères recherchés :

- Mannitol. Mobilité. Nitrate réductase.

### Résultats :

Après 24h d'incubation a 37°C



-1 : mannitol- mobilité-

-2 : mannitol- mobilité+

-3 : mannitol+ mobilité-

-4 : mannitol+mobilité+



Après  
incubation

Avant  
incubation

### 5.1.5 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

#### **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 :



Uréase+



Uréase-

- Recherche de tryptophanase (L'indole) :

L'indole produit donne une coloration d'un anneau rouge en présence du réactif de Kovacs.



Tryptophane

indole

acide pyruvique

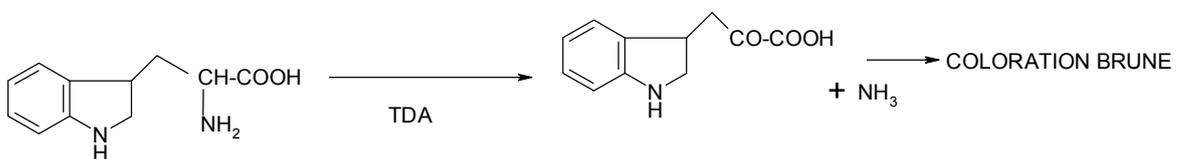
**Figure 2 : mise en évidence de la production d'indole**



**Photo : Indole +**

➤ Recherche de tryptophane désaminase :

On ajoute quelques gouttes de réactif TDA, si il ya une présence d'une coloration brune donc TDA +.



Tryptophane

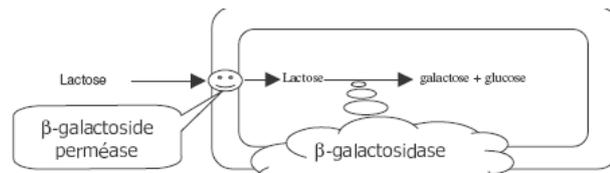
acide indole pyruvique

**Figure 3: mise en évidence de la dégradation du tryptophane par une tryptophane désaminase**

### 5.1.6 ONPG :

Recherche de la  $\beta$ -galactosidase :

Ce teste permet de rechercher la présence d'une enzyme intracellulaire nommée  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidase
2. Absence  $\beta$ -galactoside perméase

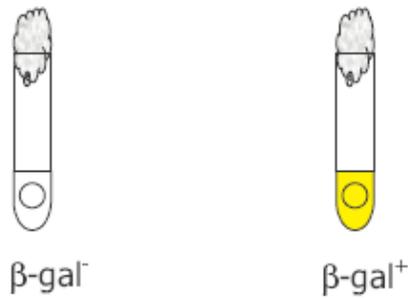
Le test ONPG permet de rechercher directement la présence de  $\beta$ -galactosidase en fournissent à la bactérie un substrat de cette enzyme : l'orthonitrophényl-  $\beta$ -D-galactopyranoside.



#### **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 :**



**5.1.6 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)

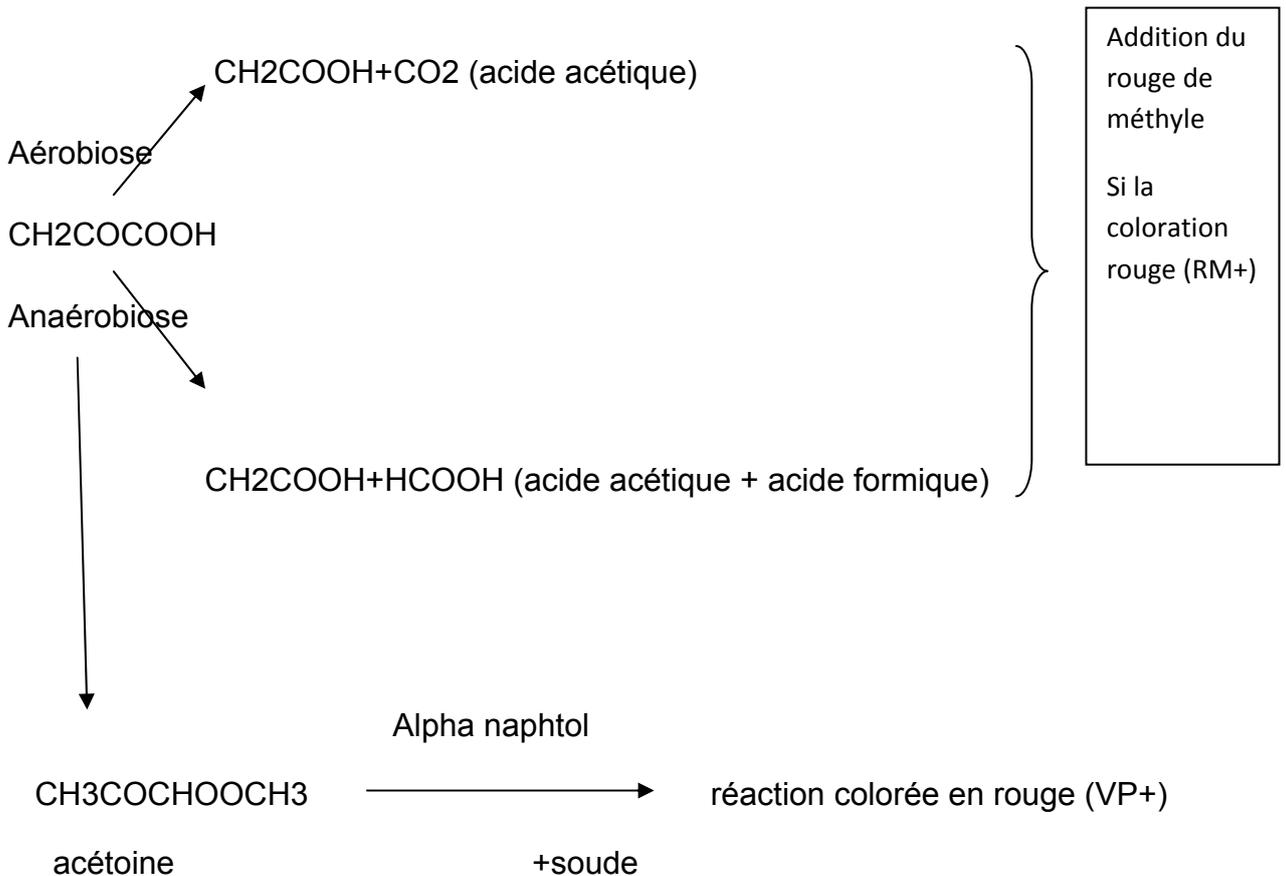
**Résultats :**

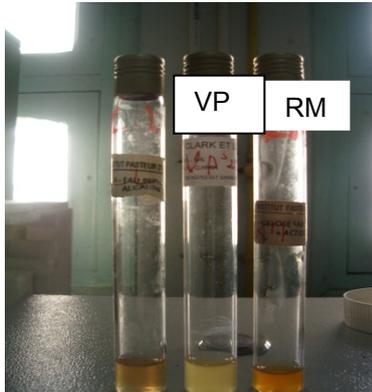
**Test VP :** - Rouge : VP+

- Jaune: VP-

**Test RM** - Rouge: RM+

- Jaune : RM-

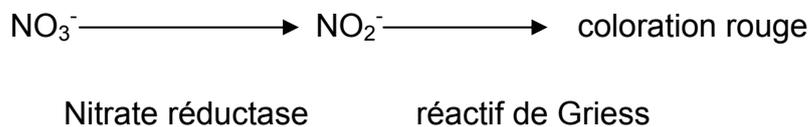




Photos : résultat de RM et VP

#### 5.1.8 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 :



#### Composition de réactif de Griess :

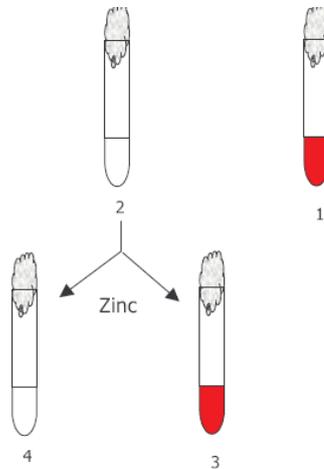
- Acide parasulfanique en milieu acide acétique (nitrite 1)
- Diméthyle- $\alpha$ -naphylamine en milieu acide acétique (nitrite 2)

#### 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+



Photo : les nitrates réductase

### **5.1.9 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.

Exemple : la souche 1 et 2 sont des citrates négative, il ya pas virage de couleur.



Photo : test de citrate après incubation

#### 5.1.10 Recherche de décarboxylase :

Trois décarboxylase sont fréquemment recherché :

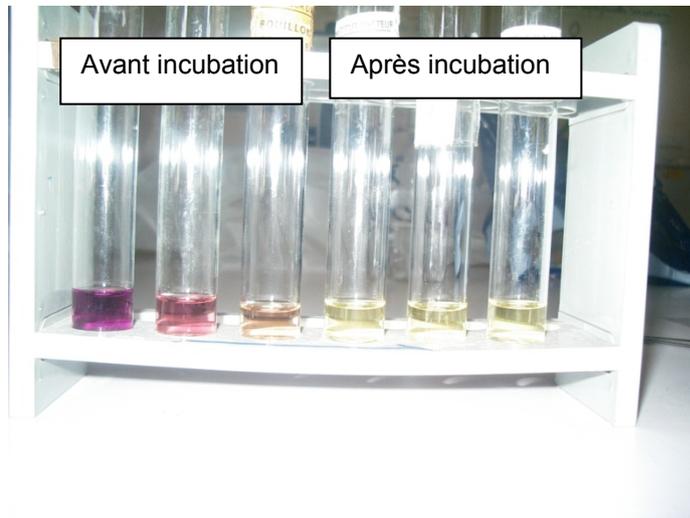
- La lysine décarboxylase (LDC)
- L'ornithine décarboxylase (ODC)
- L'arginine dihydrolase (ADH)

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'onithine, 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 violet trouble correspond à une réaction positive.



**Photo : test des acides aminés**

### 5.2 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  $\mu$ l 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 N<sub>2</sub>.
  - ajouter 02 gouttes d'acide sulfanilique (0,8 %)
  - ajouter 02 gouttes de N-N diméthyle-alpha-naphthylamine (0,05 %), attendre 2 à 3 minutes.

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 :

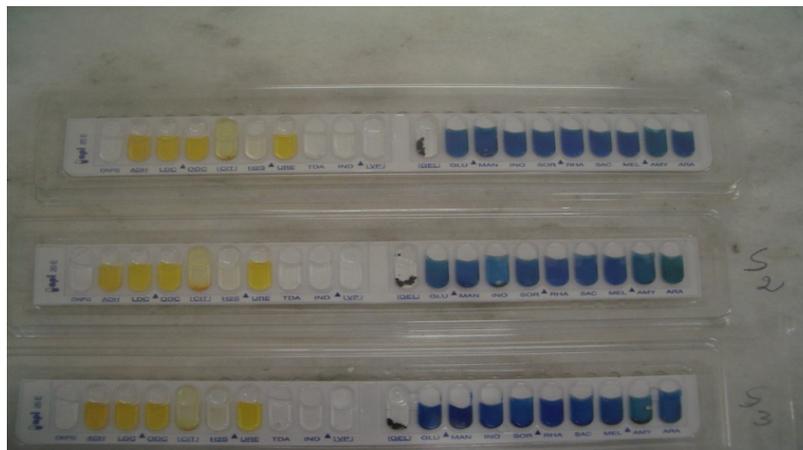
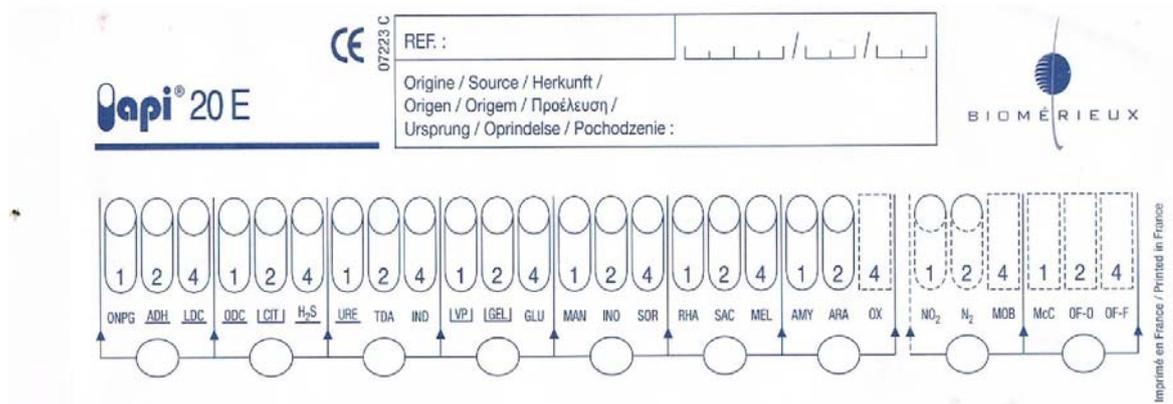
- ✓ ONPG : détermination de la présence de l'enzyme B-galactosidase
- ✓ ADH : transformation de l'arginine (acide aminé) par l'arginine déshydrolase
- ✓ LDC transformation de la lysine (acide aminé) par lysine décarboxylase
- ✓ CIT l'utilisation citrate comme seule source de Carbone
- ✓ H<sub>2</sub>S production du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) à partir de thiosulfate S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.
- ✓ 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)	Incolore/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

SOR	D-sorbitol	1,9	Fermentation/oxydase (SORbitol) (4)	Bleu/ bleu vert	jaune
RHA	L-rhamanose	1,9	Fermentation/oxydase (RHAMnose) (4)	Bleu/ bleu vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	Fermentation/oxydase (SACcharose) (4)	Bleu/ bleu vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	Fermentation/oxydase (MELibiose) (4)	Bleu/ bleu vert	jaune
AMY	Amygdaline	0,57	Fermentation/oxydase (AMYgdaline) (4)	Bleu/ bleu vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	Fermentation/oxydase (ARABinose) (4)	Bleu/ bleu vert	jaune
OX			Cytochrome-Oxydase		



Photos : API 20 E avant incubation



## ANNEXE B

La courbe d'étalonnage du MO :

Tableau 1 :

Cc (mg/L)	0	5	10	15	20
A	0	0,4018	0,7659	1,0472	1,4023

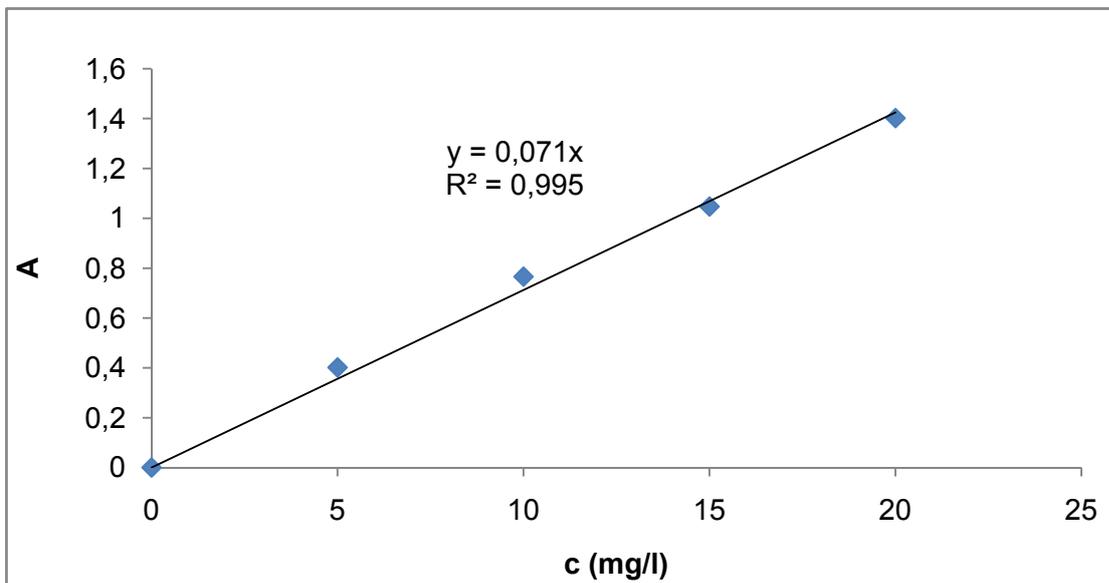


Figure 1: variation de l'absorbance en fonction de la concentration du MO à  $\lambda=465$  nm et pH = 7

Tableau 2: variation du rapport de concentration du MO dans l'extrait de betterave

T (j)	25°C	37°C
	c/c <sub>0</sub>	c/c <sub>0</sub>
0	1	1
1	0,87	0,92
2	0,79	0,64
3	0,67	0,63
6	0,40	0,41
7	0,18	0,19

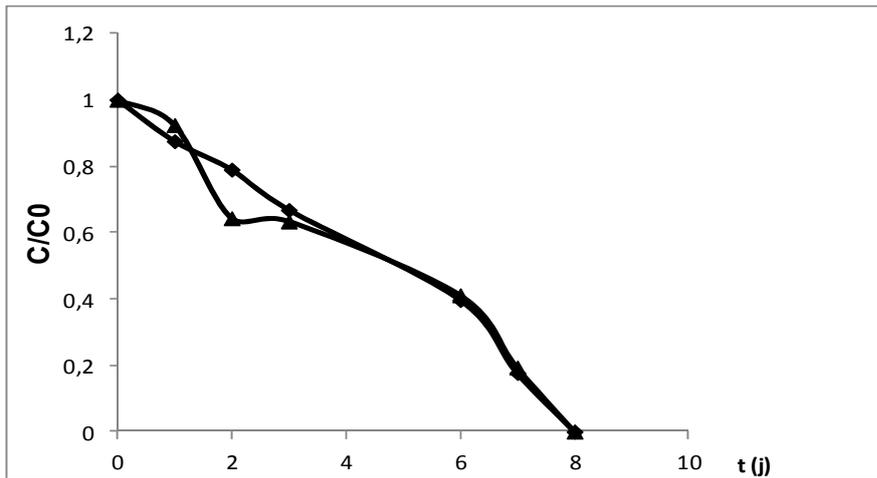


Figure 2 : diminution du rapport de la concentration du MO dans l'extrait de betterave en fonction du temps aux températures : 25 °C (◆) et 37 °C (▲).

L'analyse du graphe relatif à la variation de la concentration du MO en fonction du temps à 25°C et à la température d'incubation 37 °C, permet de remarquer l'absence de l'influence de la température sur le taux de dégradation, qui atteint son seuil maximum au bout de 8 j pour les deux températures.

Tableau 3: taux d'élimination MO dans l'extrait de betterave en fonction du temps à 25°C et 37 °C.

T (j)	25 °C	37 °C
	taux d'élimination %	Taux d'élimination %
0	0	0
1	13	8
2	21	36
3	33	37
6	60	59
7	82	81

**Tableau 4 : Variation du pH au cours de la dégradation du MO dans l'extrait de betterave :**

t (j)	pH	
	25°C	37°C
0	6,32	6,32
1	5,45	5,42
2	4,22	4,35
3	4,24	4,29
6	4,25	4,12
7	4,13	4,19
8	3,93	3,97
9	3,68	3,81
10	3,60	3,84

**Tableau 5 : Variation du pH au cours de la dégradation de l'extrait de betterave :**

t (j)	pH	
	25°C	37°C
0	6,25	6,25
1	5,19	5,5
2	4,1	4,51
3	4,15	4,21
6	4,14	4,66
7	4,15	4,45
8	3,91	4,24
9	4,09	4,50
10	3,66	4

Tableau 6 : Résultats de la biodégradation du méthyle orange par la souche 1(cloacea) issue de l'extrait betterave par UV -Visible à 465 nm:

temps (h)	25°C		37°C	
	Abs	taux d'élimination %	Abs	taux d'élimination %
0	0,716	0	0,728	0
4	0,693	3,21	0,669	8,10
24	0,402	43,85	0,272 <sup>2</sup>	62,63
28	0,341	52,37	0,198	72,80
48	0,211	70,53		

$$\text{Taux d'élimination \%} = (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_t) / \text{abs}_0$$

Avec :  $\text{Abs}_0$  : absorbance à  $t = 0$  ;

$\text{Abs}_t$  : absorbance au temps  $t$

Tableau 7 : Résultats de la biodégradation du MO par de la souche 2 (lapagei) issue de l'extrait betterave:

temps (h)	25°C		37°C	
	Abs	taux d'élimination %	Abs	taux d'élimination %
0	0,781	0	0,787	0
4	0,754	3,45	0,777	1,27
24	0,557	28,68	0,318	59,59
28	0,530	32,13	0,252	67,97
48	0,369	52,75		

Tableau 8 : résultats de la biodégradation du MO par la souche 3 issue de l'extrait betterave :

temps (h)	Biodégradation à 25°C		Biodégradation à 37°C	
	Abs	taux d'élimination %	Abs	taux d'élimination %
0	0,679	0	0,851	0
4	0,225	66,86	0,221	74,03
24	0,209	69,21	0,194	77,203
28	0,142	79,08		
48	0,140	79,38		

Tableau 9 : résultats de la biodégradation du MO par la souche 4 (aerogenes) Issue de l'extrait betterave :

temps (h)	Biodégradation à 25°C		Biodégradation à 37°C	
	Abs	taux d'élimination	Abs	taux d'élimination
0	0,928	0	0,778	0
4	0,696	25	0,631	18,89
24	0,227	75,53	0,205	73,65
28	0,185	80,06	0,197	74,67
48	0,151	83,72		

Tableau 10 : Résultats de la biodégradation du MO par le consortium:

temps (h)	Biodégradation à 25°C		Biodégradation à 37°C	
	Abs	% d'élimination	Abs	% d'élimination
0	0,681	0	0,646	0
4	0,189	72,24	0,206	68,11
24	0,186	72,86	0,180	72,13
28	0,177	74	0,172	73,37
48	0,160	76,50		

Etude de la biodégradation du MO par différentes souches séparément et le consortium:

Chaque souche à été testée et analysée en fonction du temps, et le consortium aux températures 25°C et 37°C, avec  $\lambda=465$  nm

Un suivi de L'élimination du MO par les différentes souches et le consortium à deux températures en fonction du temps à été réalisé.

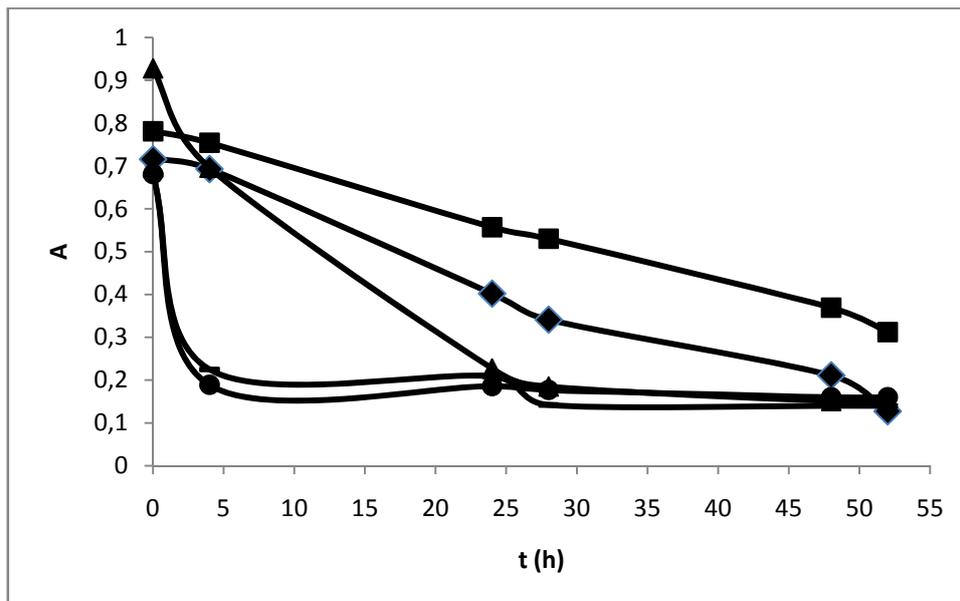


Figure 3 : Biodégradation du MO par S<sub>1</sub>(◇), S<sub>2</sub> (■), S<sub>3</sub>(■), S<sub>4</sub>(▲) et ΣS(●) a T (25 °C).

Il est bien remarquable que le taux d'élimination par la souche 3 et le consortium est très rapide et atteint respectivement les valeurs 66,86 % et 72,24 % pendant 4 heures, puis il se ralentit et devient constant atteint respectivement 79,08% et 74 % au bout de 28 heures, cela due à l'épuisement des éléments nutritifs.

Le taux de d'élimination par la souche 4 atteint 80,06 % pendant 28 heures.

Le taux de d'élimination par la souche 1 et 2 atteint respectivement 70,53 et 52,75 pendant 48 heures qui semblent lent par rapport à la souche 3 et le consortium.

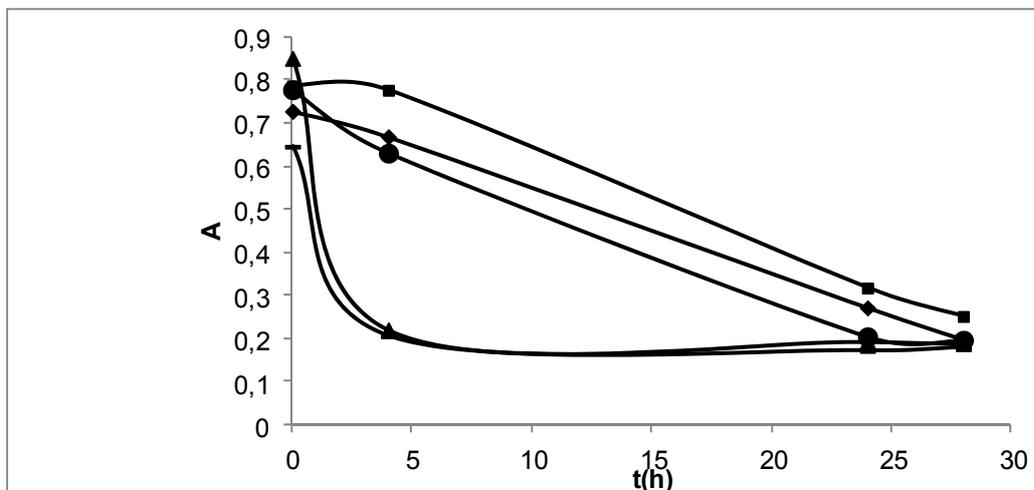


Figure 4 : Biodégradation du MO par S1 (♦), S<sub>2</sub> (■), S<sub>3</sub> (▲), S<sub>4</sub> (●) et ΣS (—) à T (37°C).

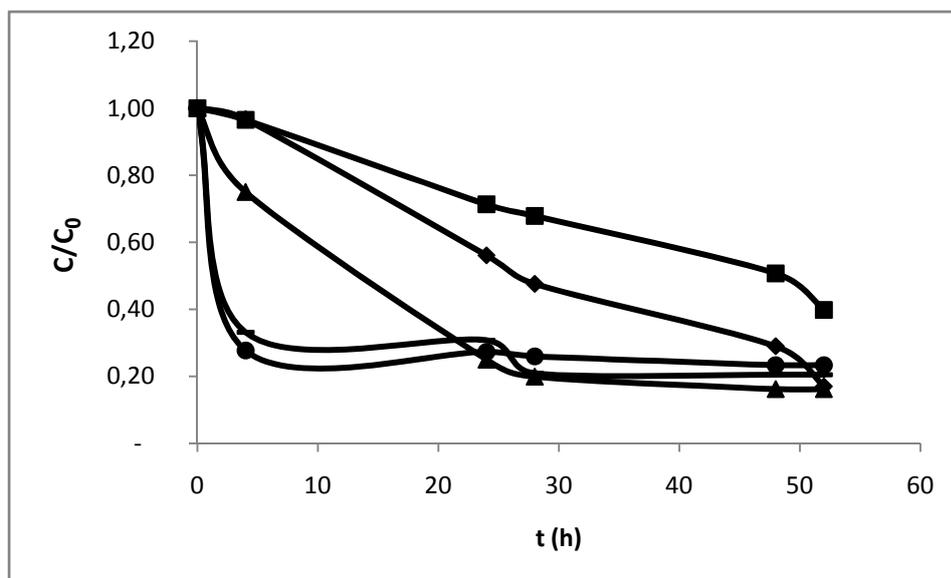
La souche 3 et le consortium donne respectivement un taux élevée de biodégradation, est de 74,03 % et 68,11 % pendant 4 heures, puis il se ralentie et devient constant cela due à l'épuisement des éléments nutritifs, et atteint respectivement 77,203 % et 72,13 % pendant 24 heures.

D'autre part le taux de dégradation par la souche 4 atteint 74,67 % pendant 28 heures.

Après ces séries de test, les résultats nous indiquent que le meilleur taux de biodégradation du MO est par la souche 3 et le consortium, et la température optimale est de 37°C.

**Tableau 11 : Variation de concentration du MO par les souches isolées à 25 °C**

$c/c_0$ t (h)	S1	S2	S3	S4	$\Sigma S$
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	0,97	0,97	0,33	0,75	0,28
24	0,56	0,71	0,31	0,25	0,27
28	0,48	0,68	0,21	0,20	0,26
48	0,29	0,51	0,20	0,16	0,23
52	0,17	0,40	0,20	0,16	0,23



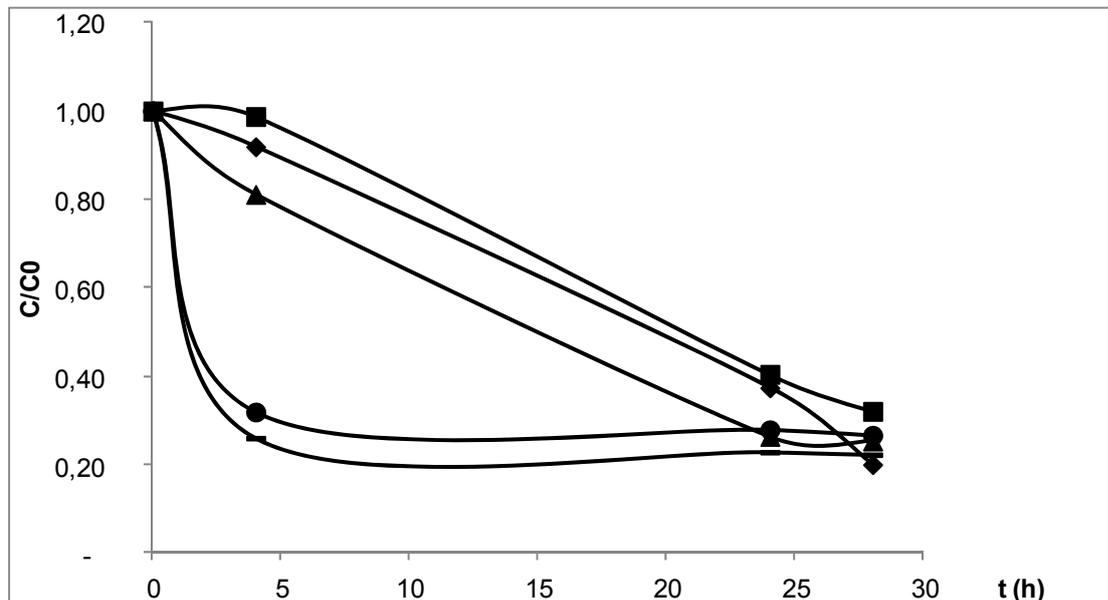
**Figure 5: Variation de la concentration du méthyle orange par  $S_1$ (◆),  $S_2$ (■),  $S_3$ (□),  $S_4$ (▲) et  $\Sigma S$ (●) a T (25 °C)**

La variation du rapport de concentration indique qu'après 4 heures la souche 3 et le consortium sont respectivement 0,33 et 0,28, par contre la souche 1, 2 et 4 sont respectivement à 0,97, 0,97 et 0,75.

La souche 1 et 2 donne respectivement un rapport de concentration de 0,29 et 0,51 après 48 heures.

**Tableau 12 : Variation de la concentration du méthyle orange par les souches à 37°C :**

$c/c_0$ t (h)	S1	S2	S3	S4	$\Sigma S$
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	0,92	0,99	0,26	0,81	0,32
24	0,37	0,40	0,23	0,26	0,28
28	0,20	0,32	0,22	0,25	0,27



**Figure 6 : variation de la concentration du MO par  $S_1$ (◆),  $S_2$  (■),  $S_3$ (—),  $S_4$ (▲) et  $\Sigma S$ (●) a T (37 °C)**

La variation du rapport de concentration indique qu'après 4 heures la souche 3 et le consortium sont respectivement 0,26 et 0,32.

Tandis que la souche 1,2 et 4 indique qu'après 28 heures, le rapport de concentration est respectivement 0,20, 0,32 et 0,25.

**Tableau 13 : Variation du taux de dégradation du MO par les souches isolées à 25°C :**

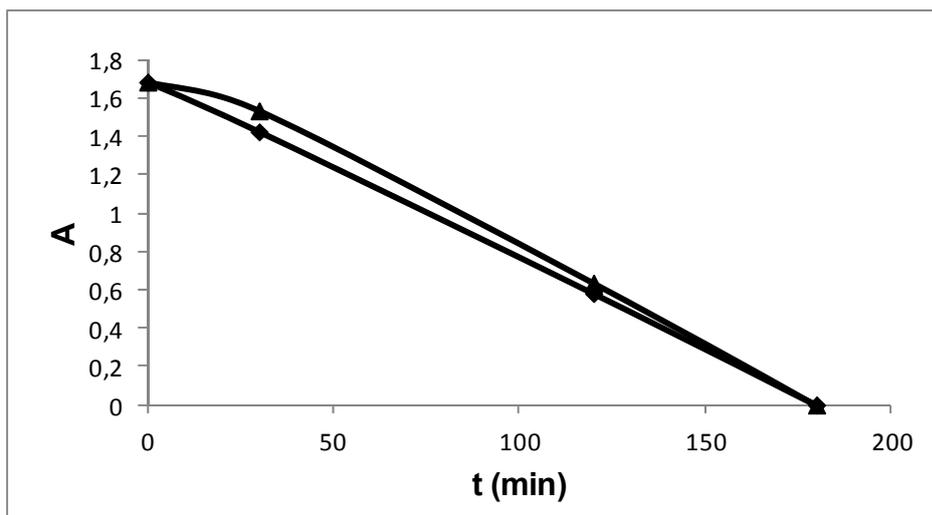
t (h) \ %	S1	S2	S3	S4	ΣS
0	0	0	0	0	0
4	3	3	67	25	72
24	44	29	69	75	73
28	52	32	79	80	74
48	71	49	79	80	74
52	83	49	79	80	74

**Tableau 14 : Variation du taux de dégradation du MO par les souches isolées à 37°C :**

t (h) \ %	S1	S2	S3	S4	ΣS
0	0	0	0	0	0
4	8	1	74	19	68
24	63	60	77	74	72
28	80	68	78	75	73

**Tableau 15 : Mesure l'absorbance de la souche 3 à λ=465nm :**

T (mn)	25°C		37°C	
	Abs	taux d'élimination %	Abs	taux d'élimination %
0	1,68	0	1,68	0
30	1,53	8.92	1,43	14,88
120	0,64	61,90	0,58	65.47
180	0	100	0	100



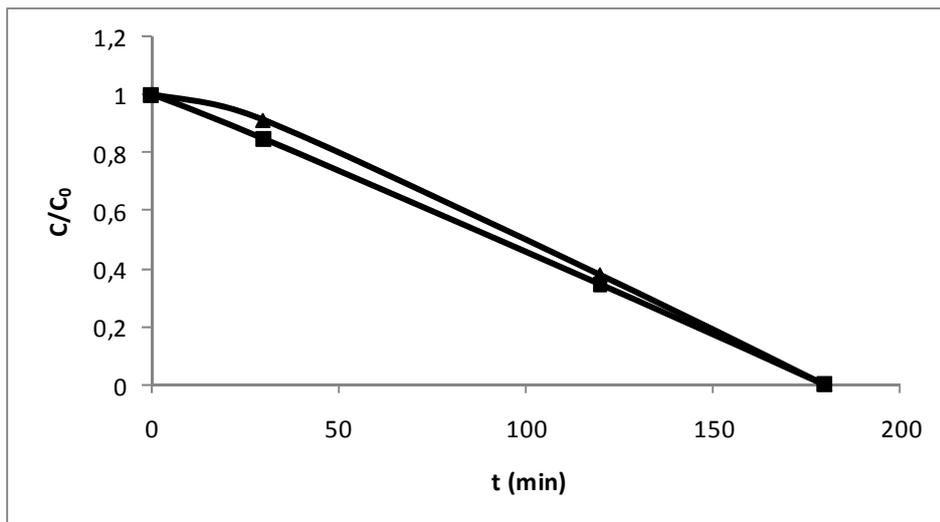
**Figure 7 : Biodégradation du MO par S<sub>3</sub> en fonction du temps : (▲) 25°C et (◆) 37°C.**

Après 120 minutes d'incubation le taux de dégradation à 25°C, 37°C atteint respectivement 61,90% et 65,47 %.

Le taux de biodégradation du MO par S3 est influencé par la température et le rapport substrat biomasse bactérienne.

**Tableau 16 : Variation de la concentration du MO par la souche 3 :**

T(°C) C/C <sub>0</sub>	25°C	37°C
0	1,00	1,00
30	0,91	0,85
120	0,38	0,35
180	0	0



**Figure 8 : Variation de la concentration du MO par S3 en fonction du temps**

25°C(▲) et 37°C (■)

**Biodégradation du MO par la souche 3 :**

Tableau 17 : Taux d'élimination % du MO par la souche 3 à 25°C et 37°C :

T (min) \ %	25°C	37°C
0	0	0
30	9	15
120	62	65
180	100	100

Suivi de la biodégradation du MO par la chromatographie en phase liquide :

Le tableau 18:

	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
C (mg/l)	10	20	40
H (µV)	2904	4719	13221

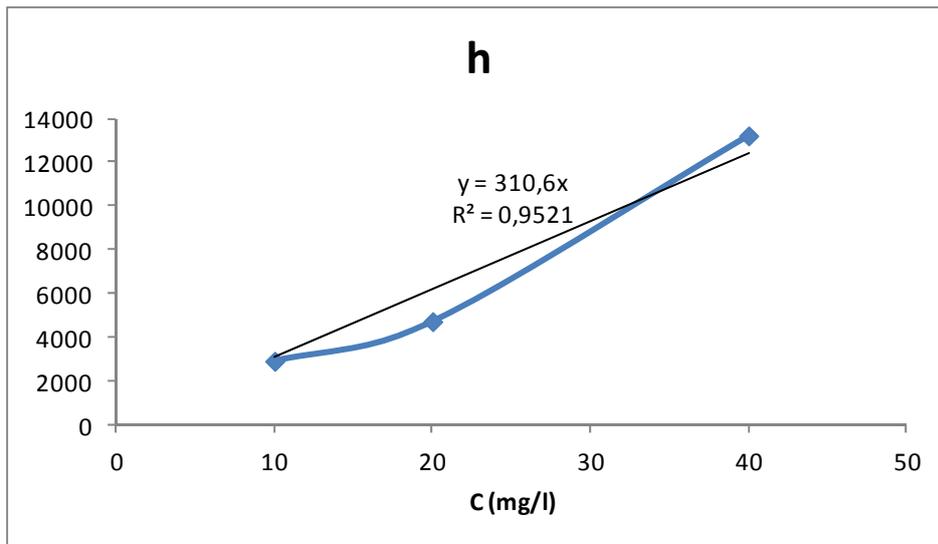


Figure 9 : variation de la hauteur en fonction de la concentration

Tableau 19 : variation de la hauteur en fonction du temps à 25 °C et 37 °C

Temps (h)	25 °C	37 °C
1	8568	2633
2	7271	1177
3	6936	385
5	3419	122
6	1755	11

$$Y = 24072 X$$

Tableau 20 : Variation de la concentration du MO en fonction du temps par

La souche 3 :

$C/C_0$ t (h)	25 °C	% d'élimination	37°C	% d'élimination
0	1	0	1	0
1	0,65	35	0,20	80
2	0,55	45	0,09	91
3	0,52	48	0,03	97
5	0,26	74	0,01	99
6	0,13	87	0,00	100

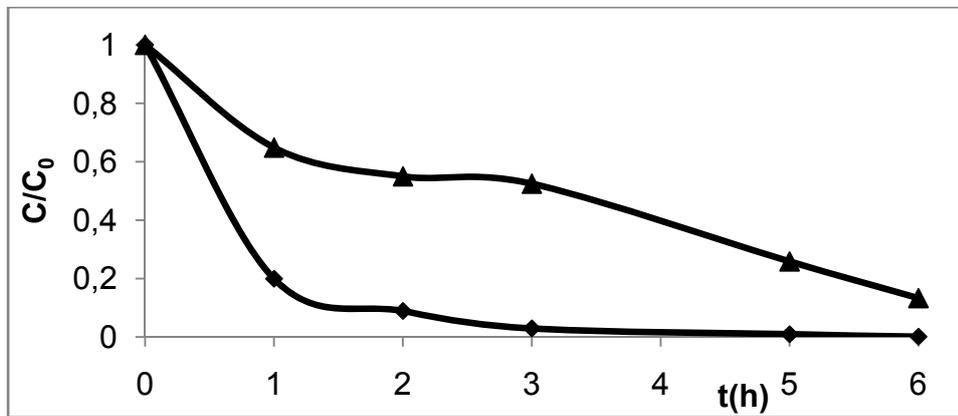


Figure 10 : Variation de la concentration du MO par S3 en fonction du temps  
25°C(▲) et 37°C (■)

## LISTE DES ABREVIATIONS

A : absorbance

API 20 E : kit d'identification des entérobactéries

DL : dose limite

DO : la densité optique

g : gramme

GN : gélose nutritive

Gx 4x10 : grossissement de l'objectif 40

Gx100 : grossissement de l'objectif 100

h : heure

H : la hauteur du pic

HPLC : chromatographie en phase liquide

J : jour

L : litre

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

ml/min : millilitre/minute

MO : méthyle orange

nm : nanomètre

pH : potentiel d'hydrogène

S : souche

T : température

t : temps

tr/min : tour/minute

UV : ultra violet

V : visible

VF : viande foie

$\lambda$  : longueur d'onde

$\Sigma S$  : le consortium

% : pourcentage d'élimination ou biodégradation

$^{\circ}C$  : degré Celsius

$\mu l$  : microlitre

$\mu V$  : micro volte

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Salomon, J.N., "danger pollution !" collection « scienteren » 2003 p37-p44.
2. Centi,G., Perathoner,S., Torre, T., Verduna M.G., "Catalytic wet oxidation with  $H_2O_2$  of carboxylic acids on homogeneous and heterogeneuos Fenton-type catalyst", Catalysis Today 2000, p 61–69.
3. l'avenir de l'environnement mondial 2000 :GEO-2000 PNUE, p42
4. Thill, G .,Ezin. J. P., "l'eau patrimoine mondial commun", presse universitaire de namur, ISBN Belgique, 1997, p146.
5. le portail de la nature et de l'écologie en Algérie, NOUARA Revue, 2011.
6. Calamari, D., Naeve.H., " revue de la pollution dans l'environnement aquatique Africain", Rome (1994).
7. "homogeneous and heterogeneuos Fenton- type catalyst",Today.200(55) 61-69 p.
8. Hertig, J. A., "Etude d'impact sur l'environnement " V 23, ISBN 2006, p279.
9. Crini,G and Badot, P.M., "traitement et épuration des eaux industrielles polluées", 2007, 23 p.
10. Moussa, A.,Martin,A.O., Decauge.V.,"histoire de l'humanité", UNESLO, 2008, 221p.
11. Milcent, R., " chimie organique heterocyvle", EDP, 2003, 402 p.
12. Sanjay, R., Sharma., Rashmi., Sargh., "odvances in water treatement and pollution prevention", springer, 2000, 66 p.
13. Jonstrup, M., Kuman, N., Murto, M and Mattiasson, B "sequential anaerobic-aerobic treatement of a zo dye:decolorisation and amine degradability" 22/07/2011
14. Foussereau, J., Dallara, J.M., "purity of standardized textile dye allergens a thin layer chromatography study contact dermatitis, 1986, 303-6 p.

15. Cavelier, C., Foussereau, J., Tamb, R., "allergie de contact et colorants (1er partie) cahier de note documentaire de L'INRS 1988, 421-43 p.
16. Le Coz, C.J., Lefeburec., Haberkorn, L., "epicutaneous chromatogram applied test.methode for allergic contact dermatitis from clothing dyes"., contact dermatitis, 2002, 46-34 p.
17. Perrin, R., Scharef J.P ., "Chimie industrielle", Tome 2.Edition Masson, Paris, 1995.
18. DEPA "Danish Environmental Protection Agency Survey of azo-colorants in Denmark Toxicity and fate of azo dyes", (2000).
19. Bauer, C., Jacques., P., Kalt, A. J., " Photochem Photobiol. A", chem, 2001, 87-92 p.
20. Stolte, M., Vieth, M, Acta Endosc.V. 31n° 2, 2001,p 125–130.
21. Jabs C.F.I., Drutz H.P., Am. J., "Obstet. Gynecol" V .185 n°6, 2001,1368–1373p.
22. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A, Pharmacol. Rev 43,(1991), 109–142 p.
23. Colin, A., "Chimie organique". Tome 2, éditions paris, (1970).
24. Nestmann, E.R., Douglas,G.R., Matula,T.I.,Grant, C.E., Kowbel, D.J., Cancer Res,V39,n°(1979), 4412-4417 p.
25. Rosenberg, N., Rousselin, X., "Rhinite et asthme professionnels aux colorants Réactifs", Document pour le médecin de travail, vol 34, 1988, 111-114 pp.
26. Hunger, K., "industrial dyes"., chemistry proprieties application effet mutagène, 2003, 626 p.
27. Kebiche. Ounissa., " Biodégradabilité, adsorbabilité et échange ionique de quelques colorants cationiques présents dans les effluents liquides de la teinturerie de l'unité couvertex de Ain. DJASSER", Thèse de Magistère Université Mentouri Constantine (1996).

28. Walsh G.E., Bahner L. H and Houninig, W. B., "Env. Pollut" Ser, V 21, (1980), 169-179 p
29. Meink, F ., Stoof, H ., Kohschuter, H., "Les eaux résiduares industrielles", Masson 2ème edition, (1977).
30. Balakina,T.D and Baktueva L. A., Plerum Publishing Corporation, (1987), 1264-1267 p.
31. Lederer, J., "Encyclopédie de l'hygiène alimentaire" Tome IV, Edition Nauwelearts.Malone S.A, (1986).
32. Brown,M., "predicting azo dye toxicity"., cristal review in environnement al science and technologie, 1993, V 23, 294-324 p.
33. Pelmont, J., "biodegradation et metabolism, les bactéries pour technique de l'environnement", EDP science, France, 2005, 7 p.
34. Vandevivere, P. C., Bianchi, R and Verstraete, W., "Treatment and Reuse of Wastewater from the Textile Wet-processing Industry", Review of Emerging Technologies, J. Chem. Technol. Biotechnol, (1998), 72-289 p.
35. Saratale, R. G., Saratale G. D., Kalyani, D. C., Chang, J. S. and Govindwar,S. P., "Enhanced Decolorization and Biodegradation of Textile Azo Dye Scarlet R by Using Developed Microbial Consortium-GR," Bioresour. Technol, (2009b),100-2493p
36. Myslak, Z. W and Bolt, H. M., "Occupational Exposure to Azo Dyes and Risk of Bladder Cancer"., Zbl. Arbeitsmed, (1998). 38-310 p
37. Ghodake, G. S., Telke, A. A., Jadhav, J. P. and Govindwar S. P., "Potential of Brrsica juncea in Order to Treat Textile Effluent Contaminated Sites", Int. J. Phytoreme, (2009a), 11-1p.
38. Forgacs, E., Cserhati,T. and Oros, G., "Removal of Synthetic Dyes from Wastewaters" A Review, Environ. Int, (2004), 30- 953 p

39. Zhang, F., A. Yediler, X. Liang, and A. Kettrup, "Effects of Dye Additives on the Ozonation Process and Oxidation By-Products: A Comparative Study Using Hydrolyzed CI Reactive Red 120," *Dyes Pigments*, (2004), 60-1 p.
40. Rai, H., Bhattacharya, M., Singh, J., Bansal, T. K., Vats, P. and Banerjee, U. C., "Removal of Dyes from the Effluent of Textile and Dyestuff Manufacturing Industry", A Review of Emerging Techniques with Reference to Biological Treatment, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*, (2005), 35-219 p.
41. Verma, P. and Madamwar, D., "Decolorization of Synthetic Dyes by a Newly Isolated Strain of *Serratia marcescens*," *World J. Microbiol. Biotechnol*, (2003), 19-615 p
42. Subramaniam, S., Sivasubramanian, S., Swaminathan, K. and Lin, F. H., "Metabolically Inactive *Trichoderma harzianum* Mediated Adsorption of Synthetic Dyes: Equilibrium and Kinetic Studies", *J. Taiwan Inst. Chem. Engrs*, (2009), 40- 394 p.
43. 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.
44. Ramakrishna, K. R. and Viraraghavan, T., "Dye Removal Using Low Cost Adsorbents", *Water Sci. Technol*, (1997), 36-189 p.
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 O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV-C and TiO<sub>2</sub>/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) 373-1213 p.
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. Eichlerova' , I., Homolka, L., Benada, O., Kofron'ova', O., Huba' lek, T . and Nerud, F., "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), 58-217 p.
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., Agteren, 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), 22-807p.

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. Adedayo, O., Javadpour, S., Taylor, C., Anderson, W. A. and Moo-Young, M., "Decolourization and Detoxication of Methyl Red by Aerobic Bacteria from a Wastewater Treatment Plant", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, (2004), 20-545 p.
86. Pandey, A., P. Singh, and L. Iyengar, "Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes," *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 59, 73 (2007).
87. Chang, J. S., Chou, C., Lin, Y., Ho, J. and Hu, T. L., "Kinetic Characteristics of Bacterial Azo- Dye Decolorization by *Pseudomonas luteola*," *Water Res.*, (2001b), 35-2041p.
88. Bromley-Challenor, K. C. A., Knapp, J. S., Zhang, Z., Gray, N. C. C., Hetheridge, M. J. and Evans, M. R., "Decolorization of an Azo Dye by Unacclimated Activated Sludge under Anaerobic Conditions", *Water Res.*, (2004), 34-4410 p.
89. Stolz, A., "Basic and Applied Aspects in the Microbial Degradation of Azo Dyes", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2001), 56-69 p.

90. Kodam, K. M., Soojhawon, I., Lokhande, P. D. and Gawai, K. R., "Microbial Decolorization of Reactive Azo Dyes under Aerobic Conditions", *World J. Microbiol. Biotechnol*, (2005), 21-367 p.
91. Sarayu, K. and Sandhya, S., "Aerobic Biodegradation Pathway for Remazol Orange by *Pseudomonas aeruginosa*", *Appl. Biochem. Biotechnol*,(2010),160-1241 p.
92. Lin, J., Zhang, X., Li, Z. and L. Lei, "Biodegradation of Reactive Blue 13 in a Two-Stage Anaerobic/Aerobic Fluidized Beds System with a *Pseudomonas* sp. Isolate", *Bioresour. Technol*, (2010), 101-34 p.
93. Nachiyar, C. V. and Rajkumar, G. S., "Purification and Characterization of an Oxygen Insensitive Azoreductase from *Pseudomonas aeruginosa*", *Enzyme Microb. Technol*, (2005), 36-503 p.
94. Stolz, A., "Basic and Applied Aspects in the Microbial Degradation of Azo Dyes", *Appl. Microbiol. Biotechnol*, (2001),56-69 p.
95. Kamilaki A., "The removal of reactive dyes from textile effluents—a bioreactor approach employing whole bacterial cells", PhD thesis, UK: University of Leeds; 2000.
96. Yoo E.S., Libra, J., Adrian, L., "Mechanism of decolorization of azo dyes in anaerobic mixed culture", *Journal of Environmental Engineering*, V .127, n° 9, 2001, 844–9 p.
97. Zimmerman, T., Kulla, H.G., Leisinger, T., "Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *pseudomonas* KF46", *European Journal of Biochemistry*, 1982, 197–203 p.

98. Bromley, C. K.A., Knapp, J.S., Zhang, Z., Gray, N.C., Hetheridge, M.J., Evans M.R., "Decolorization of an azo dye by unacclimated activated sludge under anaerobic Conditions", *Water Research*, 2000, 44:10–8 p.
99. Chang, J.S., Chou, C., Lin, Y.C., Lin, P.J., Ho, J.Y., Hu, T.L., "Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*", *Water Research*, 2001, 35:2841–50 p.
100. Willmott, N.J., "The use of bacteria–polymer composites for the removal of colour from reactive dye effluents", PhD thesis, UK: University of Leeds, 1997.
101. Sani, R.K., Banerjee, U.C., "Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme and Microbial Technology*", 1999, 24:433–7 p.
102. Dubin, P., Wright, K.L., "Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*. *Xenobiotica*", 1975, 1:563–71 p.
103. Bras, R., Ferra, I.A., Pinheiro, H.M., Goncalves, I.C., "Batch tests for assessing decolourisation of azo dyes by methanogenic and mixed cultures", *Journal of Biotechnology* 2001, 89:155–62 p.
104. Walker, R., Ryan, A.J., "Some molecular parameters influencing rate of reduction of azocompounds by intestinal microflora. *Xenobiotica*" 1971, 1:483–6 p.
105. Hu, T.L., "Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*", *Water Science and Technology* 2001, 44:261 p.
106. Greaves, A.J., Phillips, D.A.S., Taylor, J.A., "Correlation between the bioelimination of anionic dyes by an activated sewage with molecular structure", Part 1: Literature review, *Journal of the Society of Dyers and Colorists* 1999, 109:363–5-9 p.

107. Hitz, H.R., Huber, W., Reed, R.H., "The absorption of dyes on activated sludge. *Journal of the Society of Dyers and Colorists*", 1978, 71–6 p.
108. Kulla, H.G., "Biodegradation of synthetic organic colorants. In: Leisinger T, Hutter R, Cook AM, Nuesch J, editors. *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds: FEMS Symposium no. 12*. London, UK: Academic Press for the Swiss Academy of Sciences and the Swiss Society of Microbiology on behalf of the Federation of European Microbiological Societies; 1981.
109. Van der Zee, F.P., Bouwman, R.H.M., Strik D.P.B.T.B., Lettinga, G., Field J,A., "Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors", *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 691–701 p.
110. Plumb, J.J., Bell, J., Stuckey, D.C., "Microbial populations associated with treatment of an industrial dye effluent in an anaerobic baffled reactor. *Applied and Environmental*", *Microbiology*, 2001, 3226–35 p.
111. Bragger, J.L., Lloyd, A.W., Soozandehfar, S.H., Bloomfield, S.F., Marriott, C., Martin, G.P., "Investigations into the azo reducing activity of a common colonic microorganism", *International Journal of Pharmaceutics*, 1997, 61–71 p.
112. Lorengo, N.D., Novais, J.M., Pinheiro, H.M., "Effect of some operational parameters on textile dye biodegradation in a sequential batch reactor"., *Journal of Biotechnology*, 2001, 163–74 p.
113. Keck, A., Klein, J., Kudlich, M., Stolz, A., Knackmuss, H.J., Mattes, R., "Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Applied and Environmental Microbiology*" 1997, 3684–90 p.

114. Semde, R., Pierre, D., Geuskens, G., Devleeschouwer, M., Moes, A.J., "Study of some important factors involved in azo derivative reduction by *Clostridium perfringens*", *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 45–54 p.

115. Rau, J., Knackmuss, H.J., Stolz, A., " Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria", *Environmental Science and Technology* 2002, 1497–504 p.

116. Beraud, J., "le technician d'analyses biologiques", *TEC et Doc .*, Londres, paris, new York 2001, 848 p.