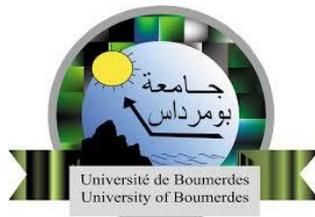


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES



Faculté De Technologie

Thèse de Doctorat

Présentée par :

M^{me} ABAI NADJET

En vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT Science** en :

Filière : Génie des procédés

Option : Génie de l'environnement

**La décoloration des eaux par des souches
bactériennes extraites à partir des produits
agroalimentaires**

Devant le jury composé de :

Messaoud-Bouraghda Mohamed Zine	Pr	UMBB	Président
Mr BENRACHEDI. Khaled	Pr	UMBB	Directeur de thèse
Mr SELATNIA. Amar	Pr	(ENP) El Harrach	Examineur
Mr KERCHICHE Yacine	MCA	(ENP) El-Harrach	Examineur
Mr AKSAS Hamouche	MCA	UMBB	Invité

Année Universitaire 2021/2022

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تحلل الأصباغ الاصطناعية بواسطة سلالات بكتيرية جديدة معزولة من المنتجات الغذائية (الطبيعية) باستخدام الميثيلين الأزرق و الأخضر الملكيت كأصباغ والشمندر الأحمر كالمنتج الغذائي.

في بادئ الامر ، اخترنا وعزلنا وحددنا ثلاث بكتيريا من لحم وقشر الشمندر الأحمر التي لديها أفضل قدرة على تحليل الأصباغ ، بكتيريا واحدة من لحم الشمندر BC1 تم تحديدها على أنها *Pseudomonas chlororaphis* واثنتان من قشر الشمندر ، تم تحديد بكتيريا BP1 على أنها *Acinetobacter Johnson II* وبكتيريا BP2 باسم *Bacillus weihenstephanensis*.

تم اختبار هذه البكتيريا إما منفصلة أو مجمعة (خليط دقيق) في التحلل البيولوجي للميثيلين الأزرق والأخضر الملكيت ، كما تمت دراسة تأثير العديد من العوامل مثل وقت التلامس ، والتركيز الأولي للصبغة ، ودرجة الحموضة ، ودرجة الحرارة وإضافة مصادر الكربون والنيتروجين الى المحلول في هذا التحلل. تم إجراء تثبيت لهذه البكتيريا في ألجينات الصوديوم ، واستخدمت الحبيبات المتكونة في إزالة الصبغتين ، الى جانب دراسة تأثير التثبيت ، عدد الحبيبات والتحرك على التحلل البيولوجي.

الكلمات المفتاحية: الأصباغ ، الميثيلين الأزرق ، الأخضر الملكيت ، البكتيريا ، التحلل الحيوي ، التثبيت ، ألجينات الصوديوم.

Résumé

Résumé :

L'objectif de cette étude est d'évaluer la dégradation des colorants synthétiques par de nouvelles souches bactériennes isolées à partir de produits agroalimentaire (naturelles) en utilisant le bleu de méthylène et le vert de malachite comme colorants et la betterave rouge comme le produit agroalimentaire.

Pour commencer on a sélectionné, isolé et identifié trois bactéries à partir de la chair et de la peau de la betterave rouge qui ont la meilleure capacité à dégrader les colorants, une bactérie à partir de la chair de la betterave BC1 identifié comme *Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca CIP 106718T HAM*, et deux à partir de la peau de la betterave , la bactérie BP1 identifiée comme *Acinetobacter Johnson II* et la bactérie BP2 comme *Bacillus weihenstephanensis*.

Ces bactéries ont été tester soit séparées, soit groupées (un micro-mélange) dans la biodégradation du bleu de méthylène et du vert de malachite, Plusieurs paramètres tels que le temps de contact, la concentration initiale du colorant, le pH, la température et l'ajout de la source de carbone et de l'azote ont été optimisés pour développer un processus de décoloration complet.

Une immobilisation de ces bactéries dans l'alginate de sodium a été effectuée, et les billes formés ont été utilisées dans l'élimination des deux colorants on étudiant l'effet de l'immobilisation, du nombre de billes et de l'agitation sur la biodégradation.

Mots clés : colorants, bleu de méthylène, vert de malachite, bactéries, biodégradation, immobilisation des bactéries, alginate de sodium.

Résumé

Abstract :

The objective of this study is to evaluate the degradation of synthetic dyes by new bacterial strains isolated from natural products using methylene blue and malachite green as dyes and beetroot as the food product.

To begin with, we selected, isolated and identified three bacteria from the flesh and the peel of red beet that have the best ability to degrade dyes, one bacteria from beet flesh BC1 identified as *Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca CIP 106718T HAM*, and two from peel of beet, the BP1 bacterium identified as *Acinetobacter Johnson II* and the BP2 bacterium as *Bacillus weihenstephanensis*.

These bacteria were tested either separated or grouped (a micro-mixture) in the biodegradation of methylene blue and malachite green, Several parameters such as contact time, initial concentration of the dye, pH, temperature and The addition of carbon and nitrogen sources have been optimized to develop a complete degradation process.

An immobilization of these bacteria in sodium alginate was carried out, and the beads formed were used in the elimination of the two dyes, studying the effect of the immobilization, the number of beads and the agitation on the biodegradation.

Key words: dyes, methylene blue, malachite green, bacteria, biodegradation, immobilization of bacteria, sodium alginate.

Dédicace

Dédicace :

A la mémoire de celui qui me manquera toujours, mon père

A mes sources d'affection et mon refuge, celles que j'aime le plus au monde, ma grand-mère et ma mère

A mon partenaire de vie, mon mari sofiane

A ma source de bonheur, mes enfants : Mustapha Ishak et Chanez,

A ma sœur Hadjer et mon frère Omar et sa famille surtout mirou.

A toute ma famille et ma belle-famille.

A tous ceux et celles qui me sont chers sans exception

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

Remerciement

Remerciement :

Cette thèse s'est effectuée au sein du Laboratoire de Recherche en Technologie Alimentaire (L.R.T.A), de l'université M'Hamed BOUGARA Boumerdes.

*Je souhaite en premier lieu remercier Mr le professeur **K. Benrachedi**, mon directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant d'effectuer cette thèse dans de bonnes conditions et ce, jusqu'à la soutenance.*

Je souhaite également remercier Mr Messaoud-Bouraghda Med Ezzine professeur à l'université M'Hamed Bougara Boumerdes pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de juger et de présider le jury de cette Thèse de doctorat.

Je remercie vivement Mr Selatnia. Amar professeur à l'ENP El-Harrach de s'être intéressé à ce travail et pour sa participation au jury.

Je remercie également Kerchiche Yacine, Maître de conférence à l'ENP d'avoir accepté d'être membre de jury de cette thèse.

Sans oublier de remercier Mr Aksas Hamouche pour sa participation au jury

Un grand merci et reconnaissance aux ingénieurs de laboratoire de Recherche Technologie Alimentaire, notamment : HIDOUS K, HADBI F pour leur soutien et leur aide.

Je tiens à remercier Mme Abed Fatma et Mme Baba Khouya Nawel, pour leur aide et leur soutien qu'elles m'ont apporté dans le cadre de cette thèse.

Je remercie toute personne qui ma soutenue moralement au moment où j'avais vraiment besoin, j'en resterai reconnaissante et j'ai l'honneur de faire votre connaissance.

Je n'oublie pas de présenter mes remerciements à tous ce qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Enfin, un grand merci à ma famille, qui m'a fait confiance, m'a aimé et comprise avec patience et amour.

Table des matières :

Introduction générale	1
Etude théorique :	
Chapitre I: Les colorants	3
I.1 Introduction :	3
I.2 Colorants naturelles :	3
I.3 Les colorants synthétiques :.....	3
I.3.1 Classification des colorants :.....	4
I.4 Les colorants et leurs impacts environnementaux :.....	9
I.5 Elimination des colorants :	12
I.5.1 Les Méthodes physiques :	12
I.5.2 Les Méthodes chimiques :.....	13
Chapitre II: Traitement biologique des colorants	15
II.1 Introduction :	15
II.2 Dégradation des colorants par les champignons :	15
II.3 Dégradation des colorants par les levures :.....	16
II.4 Dégradation des colorants par les algues :	17
II.5 Dégradation des colorants par les Bactéries :.....	17
Chapitre III: La microflore des produits agroalimentaire	23
III.1 Introduction :	23
III.2 Quelques bactéries indésirables dans les produits agroalimentaires	23
III.3 La betterave rouge et sa microflore:	25
III.3.1 Introduction :	25
III.3.2 La microflore de la betterave :.....	25
Etude expérimentale:	
Chapitre I: Matériels et méthodes	27
I.1 Les colorants utilisés	27
I.1.1 Le bleu de Méthylène :.....	27
I.1.2 Le vert de Malachite :.....	28
I.2 Microorganismes et milieu de culture :	29
I.3 Matériels utilisés	30
I.4 Méthodes :	30
I.4.1 Sélection des souches :.....	30
I.4.2 L'identification des bactéries :	31

I.4.3 Dégradation des colorants par les bactéries choisies BC1, BP1 et BP2 et le Micro-mélange :.....	32
I.4.4 L'étude cinétique de dégradation des colorants par les différentes bactéries :.....	34
I.4.5 Dégradation des colorants (BM et VM) par les bactéries et le consortium immobilisés :.....	38
Chapitre II: Résultats et discussion	40
II.1 Isolement des bactéries	40
II.2 Identification des bactéries	41
II.2.1 La bactérie <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ssp <i>aurantiaca</i>	41
II.2.2 <i>Acinetobacter Johnson II</i> :	41
II.2.3 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	41
II.3 Elimination du Bleu de Méthylène BM par les bactéries	42
II.3.1 Influence de la concentration initiale sur la dégradation du BM :.....	42
II.3.2 Influence de la température sur la dégradation du bleu de Méthylène :	46
II.3.3 Influence du pH sur la dégradation du bleu de Méthylène :	47
II.3.4 Influence de la source de carbone et de l'azote sur la dégradation du bleu de Méthylène :	49
II.4 Dégradation du vert de malachite	53
II.4.1 Influence de la concentration initiale sur la dégradation du vert de malachite :..	53
II.4.2 Influence de la température sur la dégradation du vert de malachite :	56
II.4.3 Influence de la source de carbone et d'azote sur la dégradation du vert de malachite :.....	58
II.5 L'étude cinétique de dégradation des colorants par les différentes bactéries	61
II.5.1 Détermination de l'ordre des réactions de dégradation des colorants :	61
II.5.2 Détermination de la vitesse maximale de dégradation des colorants BM et VM (Vmax) et de la constante de vitesse de décoloration (Km) :.....	73
II.6 Dégradation des colorants Bleu de méthylène et le vert de malachite par le consortium bactériens (BC1, BP1 et BP2) :	83
II.6.1 Influence de la concentration initiale :.....	83
II.6.2 Influence de la température :.....	85
II.6.3 Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par le consortium bactérien :	86
II.7 Immobilisation des bactéries :	87
II.7.1 Dégradation du bleu de méthylène par les bactéries et consortium immobilisés	87
II.7.2 Dégradation du vert de malachite par les bactéries et consortium immobilisés	.96
Conclusion Générale.....	104
Référence Bibliographique.....	107

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Principaux groupes chromophores et auxochromes classés par intensité croissante	4
Tableau 2 : Technologies de traitement mises en œuvre pour les colorants synthétiques	14
Tableau 3 : Quelques études sur la biodégradation des colorants par les champignons	16
Tableau 4 : Quelques études sur la dégradation des colorants par les algues :	17
Tableau 5 : Quelques études sur la dégradation des colorants par Culture bactérienne pure :	18
Tableau 6 : Quelques études sur la dégradation des colorants par des cultures bactériennes mixtes:	19
Tableau 7 : Quelques études sur la dégradation des colorants par des cultures bactériennes immobilisées:	22
Tableau 8 : Microflore de la betterave cru	26
Tableau 9 : Résumé des principales caractéristiques physico-chimiques du Bleu de Méthylène	27
Tableau 10 : propriétés physico-chimique du VM.....	28
Tableau 11 : Propriétés physico-chimique du l'alginate de sodium.	29
Tableau 12 : Modèles cinétiques de zéro, premier et second ordre	34
Tableau 13 : Décoloration de la gélose nutritive additionnée du colorant	40
Tableau 14 : Les fréquences du spectre IR du Bleu de Méthylène avant et après dégradation.	45
Tableau 15 : Constantes cinétiques de zéro, premier et second ordre et coefficients de corrélation obtenus dans la dégradation enzymatique du colorant BM par les bactéries BC1, BP1 et BP2 :	66
Tableau 16 : Constantes cinétiques de zéro, premier et second ordre et coefficients de corrélation obtenus dans la dégradation enzymatique du colorant VM par les bactéries BC1, BP1 et BP2 :	72
Tableau 17 : Comparaison des valeurs de Km et Vmax pour la décoloration enzymatique du colorant BM par les différentes bactéries :	77
Tableau 18 : Comparaison des valeurs de Km et Vmax pour la décoloration enzymatique du colorant VM par les différentes bactéries :	82

Liste des figures :

Figure 1: Structure moléculaire d'un colorant azoïque.....	5
Figure 2: Structure moléculaire d'un colorant anthraquinonique	5
Figure 3: Structure moléculaire d'un colorant indigoïde	5
Figure 4: Structure moléculaire d'un colorant xanthène.....	6
Figure 5: Structure moléculaire d'un colorant phtalocyanine.....	6
Figure 6: Structure moléculaire d'un colorant nitré et nitrosé.....	6
Figure 7: Structure moléculaire d'un colorant acide.....	7
Figure 8: Structure moléculaire d'un colorant cationique.....	7
Figure 9 : Schéma de la formation du colorant cuve soluble	7
Figure 10: Structure moléculaire d'un colorant direct	8
Figure 11: Structure moléculaire d'un colorant chromatable	8
Figure 12: Structure du Noir Réactif 5.....	9
Figure 13: Principales industries à l'origine du rejet de colorants dans l'environnement	10
Figure 14: Conséquences de la bioaccumulation après déversement de substances toxiques (insecticides) dans un cours d'eau.	10
Figure 15: Structures chimiques de quelques amines aromatiques toxiques.....	11
Figure 16: structure du Bleu de Méthylène.....	28
Figure 17: La structure du vert de malachite	28
Figure 18: La formule chimique de l'alginate de sodium.....	29
Figure 19: MALDI -TOF Biotyper - CM de Bruker Daltoni.....	32
Figure 20: Les étapes de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	32
Figure 21 : Représentation graphique de l'équation Michaelis-Menten	35
Figure 22 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee	37
Figure 23: choix des isolats de la peau et de la chaire de la betterave rouge.....	40
Figure 24: Le taux de dégradation du bleu de méthylène en fonction du temps et de la concentration initiale du colorant par la bactérie BC1.....	42
Figure 25 : Le taux de dégradation du bleu de méthylène en fonction du temps et de la concentration initiale du colorant par la bactérie BP1.	42
Figure 26 : Le taux de dégradation du bleu de méthylène en fonction du temps et de la concentration initiale du colorant par la bactérie BP2.	43
Figure 27 : Spectre FTIR du Bleu de Méthylène pur.....	44
Figure 28 : Spectre FTIR du Bleu de Méthylène après dégradation par BC1.	44
Figure 29: Spectre FTIR du Bleu de Méthylène après dégradation par BP1.....	44
Figure 30: Spectre FTIR du Bleu de Méthylène après dégradation par BP2.....	44
Figure 31: Pourcentage d'élimination du BM par BC1 en fonction du temps et de la température.....	46
Figure 32 : Pourcentage d'élimination du BM par BP1 en fonction du temps et de la température.....	46
Figure 33: Pourcentage d'élimination du BM par BP2 en fonction du temps et de la température.....	47
Figure 34: Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par BC1.....	48
Figure 35 : Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par BP1.	48
Figure 36 : Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par BP2.	49
Figure 37: Influence de la source de carbone sur la dégradation du bleu de méthylène par le BC1.....	49
Figure 38 : Influence de la source de carbone sur la dégradation du bleu de méthylène par le BP1	50

Figure 39 : Influence de la source de carbone et de l'azote sur la dégradation du bleu de méthylène par le BP2.	50
Figure 40 : Influence de la source d'azote sur le pourcentage d'élimination du bleu de Méthylène par BC1	51
Figure 41 : Influence de la source d'azote sur le pourcentage d'élimination du bleu de Méthylène par BP1	52
Figure 42 : Influence de la source d'azote sur le pourcentage d'élimination du bleu de Méthylène par BP2.....	52
Figure 43 : Influence de la concentration initiale sur la dégradation de VM par <i>Pseudomonas chlororaphis</i> BC1	53
Figure 44 : Influence de la concentration initiale sur la dégradation de VM par <i>Acinetobacter Johnson II</i> BP1	53
Figure 45 : Influence de la concentration initiale sur la dégradation de VM par <i>Bacillus weihenstephanensis</i> BP2.	54
Figure 46 : Spectre FTIR du vert de malachite pur.....	55
Figure 47 : Spectre FTIR du vert de malachite (Cinit=10mg/l) après dégradation par BC1..	55
Figure 48 : Spectre FTIR du vert de malachite (Cinit=10mg/l) après dégradation par BP1. ..	55
Figure 49 : Spectre FTIR du vert de malachite (Cinit=10mg/l) après dégradation par BP2 ...	55
Figure 50 : Influence de la température sur la dégradation de VM par BC1.	56
Figure 51 : Influence de la température sur la dégradation de VM par BP1.	57
Figure 52 : Influence de la température sur la dégradation de VM par BP2.	57
Figure 53 : Influence de la source de carbone sur le pourcentage d'élimination du vert de malachite par la bactérie BC1.	58
Figure 54 : Influence de la source de carbone sur le pourcentage d'élimination du vert de malachite par la bactérie BP1.....	58
Figure 55 : Influence de la source de carbone sur le pourcentage d'élimination du vert de malachite par la bactérie BP2.....	59
Figure 56 : Influence de source d'azote sur l'élimination du vert de malachite par BC1.....	60
Figure 57 : Influence de source d'azote sur l'élimination du vert de malachite par BP1	60
Figure 58 : Influence de source d'azote sur l'élimination du vert de malachite par BP2.	60
Figure 59 : Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BC1.	61
Figure 60 : Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BC1.	62
Figure 61 : Cinétique du second ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BC1.	62
Figure 62 : Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP1.....	63
Figure 63 : Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP1.....	63
Figure 64 : Cinétique du deuxième ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP1	64
Figure 65 : Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP2.....	64
Figure 66 : Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP2.....	65
Figure 67 : Cinétique du deuxième ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP2.	65
Figure 68 : Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BC1.....	67

Figure 69: Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BC1.	67
Figure 70 : Cinétique du second ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BC1.	68
Figure 71 : Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP1.	68
Figure 72 : Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP1.	69
Figure 73 : Cinétique du deuxième ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP1.	69
Figure 74: Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP2.	70
Figure 75: Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP2.	70
Figure 76 : Cinétique du deuxième ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP2.	71
Figure 77 : Représentation graphique de l'équation de MICHALEIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de BM par BC1.	73
Figure 78 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de BM par BC1.	73
Figure 79 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de BM par BC1.	74
Figure 80 : Représentation graphique de MICHALEIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de BM par BP1.	74
Figure 81 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de BM par BP1.	75
Figure 82 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de BM par BP1.	75
Figure 83 : Représentation graphique de MICHALEIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de BM par BP2.	76
Figure 84 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de BM par BP2.	76
Figure 85 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de BM par BP2.	77
Figure 86 : Représentation graphique de l'équation de MICHALEIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de BM par BC1.	78
Figure 87: Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de VM par BC1.	78
Figure 88 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de VM par BC1.	79
Figure 89: Représentation graphique de MICHALEIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de VM par BP1.	79
Figure 90 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de VM par BP1.	80
Figure 91 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de VM par BP1.	80
Figure 92: Représentation graphique de MICHALEIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de VM par BP2.	81
Figure 93 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de VM par BP2.	81

Figure 94: Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de VM par BP2.....	82
Figure 95 : Influence de la concentration initiale sur la dégradation du bleu de méthylène par le consortium bactérien.	83
Figure 96: Spectre FTIR du bleu de méthylène avant et après dégradation par le consortium bactérien.	83
Figure 97 : Influence de la concentration initiale sur la dégradation du vert de malachite par le consortium bactérien.	84
Figure 98 : Spectre FTIR du vert de malachite avant et après dégradation par le consortium bactérien.	85
Figure 99: Influence de la température sur la dégradation du bleu de méthylène par le consortium bactérien	85
Figure 100: Influence de la température sur la dégradation du vert de malachite par le consortium bactérien.	86
Figure 101: Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par le consortium bactérien	86
Figure 102: Influence de l'immobilisation de la bactérie BC1 sur l'élimination du BM	87
Figure 103 : Spectre FTIR du bleu de méthylène après dégradation par BC1 immobilisée ...	88
Figure 104: Influence de l'immobilisation de la bactérie BP1 sur l'élimination du BM.....	88
Figure 105: Spectre FTIR du bleu de méthylène après dégradation par Bp1 immobilisée	89
Figure 106: Influence de l'immobilisation de la bactérie BP2 sur l'élimination du BM	89
Figure 107 : Spectre FTIR du bleu de méthylène après dégradation par BP2 immobilisée. .	90
Figure 108 : Influence de l'immobilisation du micro-Mélange sur l'élimination du BM.....	90
Figure 109: Spectre FTIR du bleu de méthylène après dégradation par le micro-mélange immobilisé.....	91
Figure 110 : Influence du nombre de billes du BC1 sur l'élimination du bleu.....	92
Figure 111 : Influence du nombre de billes du BP1 sur l'élimination du bleu.....	92
Figure 112: Influence du nombre de billes du BP2 sur l'élimination du bleu.	93
Figure 113: Influence du nombre de billes du Micro-Mélange sur l'élimination du bleu.....	93
Figure 114: Influence de l'agitation sur l'élimination du BM par BC1 immobilisée	94
Figure 115: Influence de l'agitation sur l'élimination du BM par BP1 immobilisée.....	94
Figure 116: Influence de l'agitation sur l'élimination du BM par BP2 immobilisée.....	95
Figure 117: Influence de l'agitation sur l'élimination du BM par le consortium immobilisé..	95
Figure 118: Influence de l'immobilisation du BC1 sur l'élimination du vert de Malachite	96
Figure 119 : Spectre FTIR du vert de malachite après dégradation par BC1 avant et après immobilisation.....	96
Figure 120: Influence de l'immobilisation du PB1 sur l'élimination du VM.	97
Figure 121 : Spectre FTIR du vert de malachite après dégradation par BP1 avant et après immobilisation.....	97
Figure 122: Influence de l'immobilisation du BP2 sur l'élimination du VM.	98
Figure 123: Spectre FTIR du vert de malachite après dégradation par BP2 avant et après immobilisation.....	98
Figure 124: Influence de l'immobilisation du consortium bactérien sur l'élimination du VM	99
Figure 125: Spectre FTIR du vert de malachite après dégradation par le micro mélange avant et après immobilisation.	99
Figure 126: Influence du nombre de billes de BC1 sur l'élimination du VM	100
Figure 127: Influence du nombre de billes de BP1 sur l'élimination du VM.	100
Figure 128: Influence du nombre de billes de BP2 sur l'élimination du VM.	101
Figure 129: Influence du nombre de billes du consortium sur l'élimination du VM.	101
Figure 130: Influence de l'agitation sur l'élimination du VM par BC1 immobilisée.	102

Figure 131: Influence de la vitesse d'agitation sur l'élimination du VM par BP1 immobilisée	102
Figure 132: Influence de l'agitation sur l'élimination du VM par BP2 immobilisée.	103
Figure 133: Influence de l'agitation sur l'élimination du VM par le consortium immobilisé	103

Abréviations

Abréviations :

DCO : demande chimique de l'oxygène

Ph : potentiel hydrogène

Lab : lactic acid bacteria

ufc/g: unité formant colonie, le nombre de bactéries dans un gramme de betterave

BM : bleu de méthylène

VM : vert de malachite

BN : bouillon nutritif

DO initiale : densité optique du colorant

DO finale : densité optique du colorant après dégradation

I R T F : Analyse structurale par spectroscopie infrarouge

C_{init} : concentration initiale

BC1 : la bacterie Pseudomonas chlororaphis

BP1 : la bacterie Acinetobacter Johnson II

BP2 : la bacterie Bacillus weihenstephanensis.

C_t : la concentration de colorant dans la solution (mg l^{-1}) à un temps t

C₀ : la concentration initiale du colorant dans la solution (mg l^{-1}).

V_{max} : la vitesse maximale de consommation du substrat (BM, MG) en $\text{mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$

V : la vitesse de consommation du substrat en $\text{mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$

S : la concentration du substrat en mg l^{-1}

K_m : la constante de Michaelis -Menten en mg l^{-1}

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Introduction générale :

L'industrialisation rapide de ces dernières années a été principalement considérée comme l'une des principales causes de l'augmentation massive des problèmes environnementaux, notamment la pollution de l'air, du sol et de l'eau [1-3], Divers facteurs environnementaux ont un impact énorme sur la vie des êtres humains, des animaux, des plantes et des microorganismes en particulier la pollution de l'eau [3].

La pollution de l'eau est causée par le déversement de diverses matières dangereuses par différentes industries, elle est considérée comme un problème majeur pour la santé dans le monde, en particulier dans les pays développés et en voie de développement, compte tenu de la forte croissance démographique et le développement économique [3-5].

La pollution de l'eau par les substances dangereuses ou toxiques générées par l'industrie, l'agriculture et les habitations comprennent divers colorants, engrais, insecticides, métaux lourds comme le mercure Hg, le cuivre Cu, le chrome Cr et le plomb Pb, détergents synthétiques, huiles, solvants, désinfectants, produits chimiques, etc.[3, 6, 7].

Les colorants sont largement utilisés dans de nombreuses industries comme les textiles, les cosmétiques, le papier, le tannage et les industries alimentaires [8, 9]. Plus de 700000 tonnes de colorants sont produites chaque année dont 140 0000 sont rejetées dans les effluents au cours des étapes d'application et de confection [10], et vue la toxicité et la nature xénobiotique des colorants qui les rend persistants dans l'environnement et réfractaires aux dégradations dans le milieu naturel , il est nécessaire de les traiter avant leurs déversements dans le milieu naturel [11].

Depuis les dernières décennies, différentes techniques ont été développés pour éliminer les colorants toxiques des effluents textiles tels que la coagulation floculation [12-14],l'osmose inverse [15-17], l'oxydation ou la réduction chimique [18, 19] et la dégradation photocatalytique [20-22].

Les méthodes physico-chimiques sont des procédés chères et compliqués et qui produits des grandes quantités de boues ainsi que des métabolites cancérigènes et mutagènes à cause d'une élimination incomplète des colorants toxiques [23, 24] , c'est pour cela qu'on a besoin de développer des méthodes économiques et efficaces pour l'élimination totale des colorants tel que le traitement biologique.

Introduction générale

Le traitement biologique est très efficace pour une large gamme de colorants [25, 26], en plus des avantages d'être rentable et respectueux de l'environnement [25, 27, 28].

Dans ce cas, de nombreuses espèces bactériennes appartenant à divers phylums tels que Bacteroidetes, les acidobactéries, les actinobactéries, les protéobactéries et les firmicutes ont été isolés et identifiés [29-31], et ont montrés une dégradation très efficace des colorants, ces bactéries peuvent être isolés du sol, de l'eau et des aliments.

Notre objectif est de développer un procédé original et innovateur de biodégradation des colorants, à l'aide de souches bactériennes issues de produits agroalimentaires.

Ce procédé permettra à la fois de :

1. Valoriser des souches bactériennes issues de produits naturels,
2. Résoudre un problème de pollution (de manière plus efficiente que par les procédés physico-chimiques et à moindre coût),

Le but de notre travail est d'isoler et d'identifier des souches bactériennes possédant une forte capacité à dégrader des colorants cationiques le bleu de méthylène et le vert de malachite à partir de la betterave rouge comme produits agroalimentaires.

En premier lieu on a procédé à l'isolement, la sélection et l'identification des bactéries à partir de la chair ainsi qu'à partir de l'épluchure de la betterave rouge cultivée dans la région de Boumerdes en Algérie, on a choisis trois bactéries, une 01 isolée à partir de la chair BC1 et deux 2 à partir de l'épluchure de la betterave BP1 et BP2. Ces bactéries et leur consortium bactérien (BC1, BP1 et BP2) ont été utilisés dans la dégradation du bleu de méthylène et du vert de malachite en étudiant l'effet de la concentration initiale, du pH, de la température d'incubation ainsi que l'ajout de la source de carbone et de l'azote sur la biodégradation.

En deuxième lieu, on a procédé à l'immobilisation de ces bactéries et le consortium dans l'alginate de sodium et les billes formés ont été utilisées dans l'élimination des deux colorants. L'effet de l'immobilisation, du nombre de billes et de l'agitation sur la biodégradation a été étudié.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les colorants

Chapitre I: Les colorants

I.1 Introduction :

Un colorant par définition est une substance fortement colorée qui interagit avec le milieu dans lequel elle est introduite, pour lui apporter une couleur en s'y dissolvant et en s'y dispersant [32] , L'homme a mis des couleurs dans sa vie dès les débuts de son aventure : peintures rupestres d'Altamira et de Lascaux, céramiques mésopotamiennes, vêtements des tombes égyptiennes, décors corporels des populations primitives, etc.

Il a d'abord utilisé les pigments des « terres colorées », puis ceux des fibres végétales et animales. L'industrie des colorants constitue aujourd'hui un domaine capital de la chimie. Les colorants sont employés pour l'impression et la teinture des fibres textiles, des papiers, des cuirs, des fourrures, des bois, des matières plastiques et des élastomères. Ils servent aussi à préparer des peintures, des encres d'imprimerie, des vernis et, comme additifs, à colorer des produits alimentaires et pharmaceutiques. Ils sont utilisés dans l'industrie des cosmétiques, la coloration des métaux (aluminium anodisé), la photographie (sensibilisateurs), la biologie (coloration des préparations microscopiques), les indicateurs colorés, et certains d'entre eux sont employés en thérapeutique (antiseptiques, antimalariques, etc.).[33]

Les premiers colorants employés par l'Homme semblent avoir été d'origine minérale (terres colorées). Quand celui-ci a maîtrisé la technique du tissage, il s'est servi de teintures d'origine végétale ou animale, On distingue deux grandes familles de colorants : les colorants naturels (extraits de matières minérales ou organiques) et ceux issus de la synthèse chimique.

I.2 Colorants naturelles :

- a) Végétale : indigo, garance, roucon, safran, orseille, cachou, curcuma, naprum, pastel, noix de galle, gaude,...
- b) Animale : cochenille, kernès, pourpre,...
- c) Minérale : oxyde de fer, bleu de prusse, graphite,...

I.3 Les colorants synthétiques :

L'industrie des colorants synthétiques est née en 1856 quand le chimiste anglais W. H. Perkin, dans une tentative de synthèse de la quinine artificielle pour soigner la malaria, a obtenu la première matière colorante synthétique qu'il appela "mauve" (aniline, colorant basique). Perkin a breveté son invention et a installé une chaîne de production, qui serait bientôt suivie par d'autres. De nouveaux colorants synthétiques commencent à paraître sur le marché. Ce processus a été stimulé

par la découverte de la structure moléculaire du benzène en 1865 par Kékulé. En conséquence, au début du 20ème siècle, les colorants synthétiques ont presque complètement supplantés les colorants naturels] [34].

Les colorants synthétiques occupent actuellement une place importante dans le secteur industriel. Ils sont largement utilisés dans l'industrie du papier, cosmétique, agroalimentaire et notamment dans l'industrie textile [35].

Les matières colorantes se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (de 380 à 750 nm). La transformation de la lumière blanche en lumière colorée par réflexion sur un corps, ou par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés chromophores, la molécule colorante étant le chromogène (Figure 1). Plus la facilité du groupe chromophore à donner un électron est grande, plus la couleur sera intense (groupes chromophores classés par intensité décroissante dans le tableau 1) [33]. D'autres groupes d'atomes du chromogène peuvent intensifier ou changer la couleur dû au chromophore : ce sont les groupes auxochromes.

Tableau 1 : Principaux groupes chromophores et auxochromes classés par intensité croissante [33]

<i>Groupes chromophores</i>	<i>Groupes auxochromes</i>
Azo (-N=N-)	Amino (-NH ₂)
Nitroso (-NO ou -N-OH)	Méthylamino (-NHCH ₃)
Carbonyl (=C=O)	Diméthylamino (-N(CH ₃) ₂)
Vinyl (-C=C-)	Hydroxyl (-HO)
Nitro (-NO ₂ ou =NO-OH)	Alkoxy (-OR)
Sulphure (>C=S)	Groupes donneurs d'électrons

I.3.1 Classification des colorants :

La classification des colorants n'obéit à aucune règle absolue, Certains auteurs regroupent ces colorants d'après leur constitution chimique, en tenant compte de la nature des chromophores qui les composent : groupement azoïque, anthraquinone, triarylméthane et phtalocyanine [36]; d'autres les regroupent d'après les diversités des technologies d'application : colorants anioniques (acides, à mordant-acide, directs, réactifs, de cuve, colorants au soufre) ou cationiques (basiques) [37].

I.3.1.1 Classification chimique [33] :

- **Les colorants azoïques :**

Les colorants "azoïques" sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo (-N=N-) unissant deux groupements alkyles ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique).

Ces structures qui reposent généralement sur le squelette de l'azobenzène, sont des systèmes aromatiques ou pseudo aromatiques liés par un groupe chromophore azo.

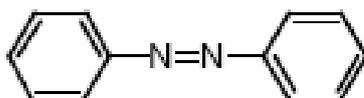


Figure 1: Structure moléculaire d'un colorant azoïque

- **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 amino.

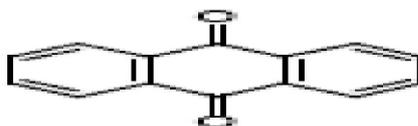


Figure 2: Structure moléculaire d'un colorant anthraquinonique

- **Les colorants indigoïdes :** tirent leur appellation de l'indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues sélénié, soufré et oxygéné du bleu indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquoise.

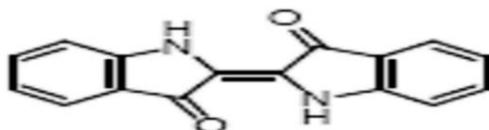


Figure 3: Structure moléculaire d'un colorant indigoïde

- **Les colorants xanthène :** Dont le composé le plus connu est la fluorescéine, sont dotés d'une intense fluorescence. Peu utilisés en tant que teinture, leur faculté de marqueurs lors d'accident maritime ou de traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines est malgré tout bien établie.



Figure 4: Structure moléculaire d'un colorant xanthène.

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

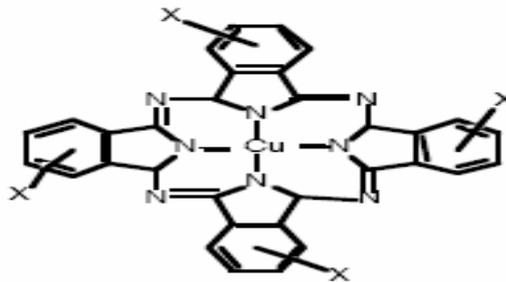


Figure 5: Structure moléculaire d'un colorant phtalocyanine.

- **Les colorants nitrés et nitrosés** 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 nitro (- NO₂) en position ortho d'un groupement électro donneur (hydroxyle ou groupes aminés).

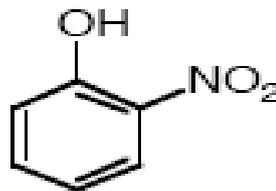


Figure 6: Structure moléculaire d'un colorant nitré et nitrosé.

I.3.1.2 Classification tinctoriale :

- **Les colorants acides ou anioniques :** Très solubles dans l'eau grâce à leurs groupes sulfonate ou carboxylate, ils sont ainsi dénommés parce qu'ils permettent de teindre les fibres animales (laine et soie) et quelques fibres acryliques modifiées (nylon, polyamide) en bain légèrement acide. L'affinité colorant - fibre est le résultat de liaisons ioniques entre la partie acide sulfonique du colorant et les groupes amino des fibres textiles.

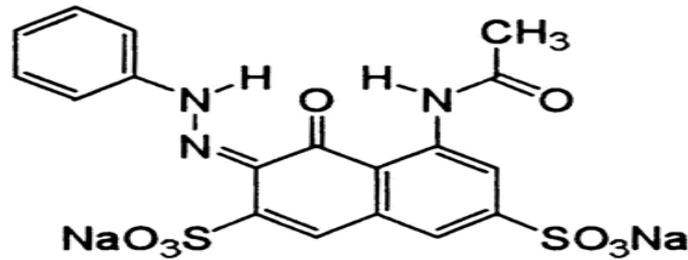


Figure 7: Structure moléculaire d'un colorant acide

- Les colorants basiques ou cationiques** : Classe des colorants porteurs d'ions positifs et reconnus pour leurs nuances brillantes. Les colorants basiques se composent de grosses molécules et ce sont des sels solubles dans l'eau. Ils ont une affinité directe pour la laine et la soie et peuvent être utilisés sur le coton. La solidité des colorants basiques sur ces fibres est très faible. Ces colorants ont bénéficié d'un regain d'intérêt avec l'apparition des fibres acryliques, sur lesquelles ils permettent des nuances très vives et résistantes.

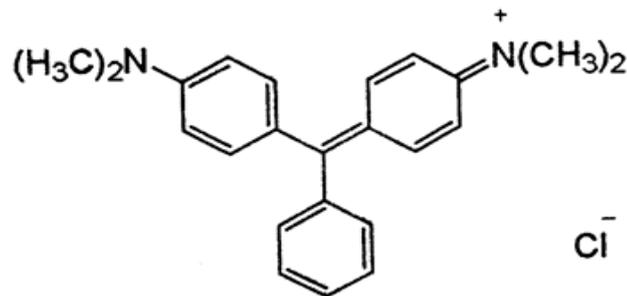


Figure 8: Structure moléculaire d'un colorant cationique

- Les colorants de cuve** : sont des colorants insolubles dans l'eau, appliqués sur la fibre après transformation par réduction alcaline en leuco-dérivés. La teinture se termine par la réoxydation in situ du colorant sous sa forme insoluble initiale.

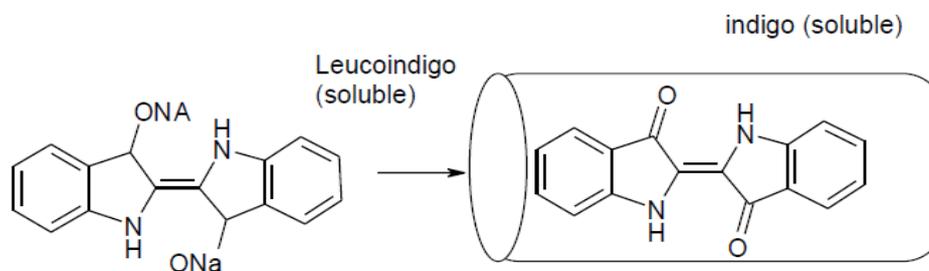


Figure 9 : Schéma de la formation du colorant cuve soluble

Réputés pour leur bonne résistance aux agents de dégradation (lavage, rayons solaires), les colorants de cuve sont largement utilisés sur le coton, le lin, la rayonne et autres fibres cellulosiques, à l'image de l'indigo pour la teinture des articles jean ou denim.

- **Les colorants directs** : contiennent ou sont capables de former des charges positives ou négatives électrostatiquement attirées par les charges des fibres. Ils se distinguent par leur affinité pour les fibres cellulosiques sans application de mordant, liée à la structure plane de leur molécule.

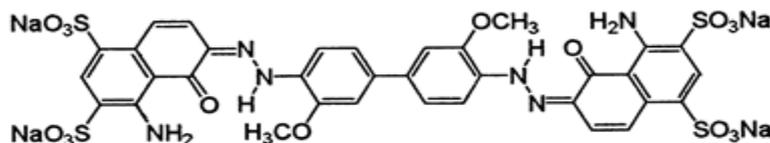


Figure 10: Structure moléculaire d'un colorant direct

- **Les colorants à mordants** : les colorants à mordant sont caractérisés par la présence des groupements fonctionnels capables de réagir avec des sels métalliques qui ont été fixé après un traitement préalable sur la fibre. Il en résulte la formation d'un complexe très solide et stable. En teinturerie industrielle, les sels les plus utilisés sont à base de bichromate, c'est pourquoi on parle de colorants au chrome.

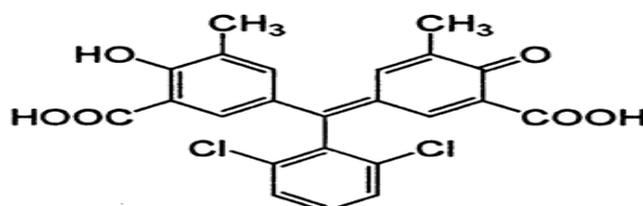


Figure 11: Structure moléculaire d'un colorant chromatable

- **Les colorants réactifs** contiennent des groupes chromophores issus essentiellement des familles azoïque, anthraquinonique et phtalocyanine. Leur appellation est liée à la présence d'une fonction chimique réactive, de type triazinique ou vinylsulfone, assurant la formation d'une liaison covalente forte avec les fibres. Solubles dans l'eau, Ils sont capables de teindre les fibres cellulosiques, les fibres d'origine animale et les fibres polyamides. Un exemple représentatif de cette famille est illustré sur la figure suivante :

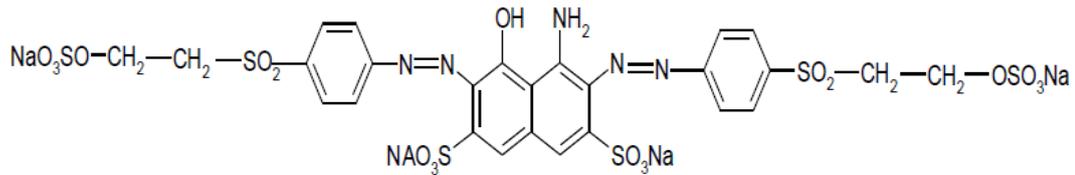


Figure 12: Structure du Noir Réactif 5

- **Les colorants développés ou azoïques insolubles :** Ce type de colorants est insoluble. Il se développe directement sur la fibre grâce à une réaction de couplage qui se produit entre une base diazotée et un agent de couplage. Cette classe de colorant permet d'obtenir des teintures très solides de manières générales sur les fibres cellulosiques.
- **Les colorants dispersés :** appelés aussi plastosolubles sont très peu solubles dans l'eau et sont appliqués sous forme d'une fine poudre dispersée dans le bain de teinture. Ils sont en mesure, lors d'une teinture à haute température, de diffuser dans les fibres synthétiques puis de s'y fixer. Les colorants dispersés sont largement utilisés dans la teinture de la plupart des fibres manufacturées, surtout le polyester.
- **Les colorants au soufre :** sont insolubles dans l'eau mais appliqués sous forme d'un dérivé soluble après réduction par le sulfure de sodium. Ils sont ensuite réoxydés à leur état insoluble dans la fibre. Les colorants au soufre sont généralement employés sur le coton pour produire des teintes foncées économiques, dont la solidité au lavage et à la lumière va de moyenne à bonne.
- **Colorants d'oxydations :** ces colorants sont obtenus par imprégnation de la fibre, avec certaines bases aromatiques, suivie d'oxydation, Le noir d'aniline est le plus important.
- **Colorants plastosolubles :** Ces colorants sont généralement de nature azoïque ou anthraquinonique et se fixent dans les fibres synthétiques sous la forme d'une solution solide, d'où leur dénomination de plastosolubles.
- **Les pigments :** Les pigments sont des molécules insolubles dans l'eau et ne présentent aucune affinité pour les fibres textiles. Étant donné ces caractéristiques, ils ne peuvent être appliqués qu'en les fixant à la surface des fibres à l'aide d'un liant. On peut également les utiliser pour la coloration dans la masse des fibres artificielles et synthétiques avant filage.

I.4 Les colorants et leurs impacts environnementaux :

Beaucoup de colorants sont visibles dans l'eau même à de très faibles concentrations (< 1 mg L⁻¹). Ainsi, ils contribuent aux problèmes de pollution liés à la génération d'une quantité

considérable d'eau usée contenant des colorants résiduels [38] Le rejet de ces eaux résiduaires dans l'écosystème est une source dramatique de pollution, d'eutrophisation et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique et par conséquent présente un danger potentiel de bioaccumulation qui peut affecter l'homme par transport à travers la chaîne alimentaire.

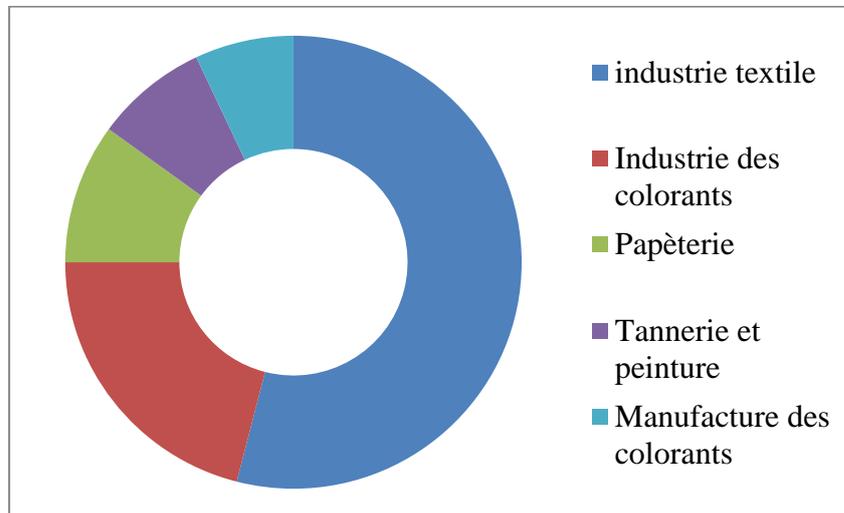


Figure 13: Principales industries à l'origine du rejet de colorants dans l'environnement [39].

➤ BIO-ACCUMULATION

Si un organisme ne dispose pas de mécanismes spécifiques, soit pour empêcher la résorption d'une substance, soit pour l'éliminer une fois qu'elle est absorbée, alors cette substance s'accumule. Les espèces qui se trouvent à l'extrémité supérieure de la chaîne alimentaire, y compris l'homme, se retrouvent exposées à des teneurs en substances toxiques pouvant aller jusqu'à cent mille fois plus élevées que les concentrations initiales dans l'eau (illustration du phénomène de bioaccumulation de pesticides (Figure I.4-1).

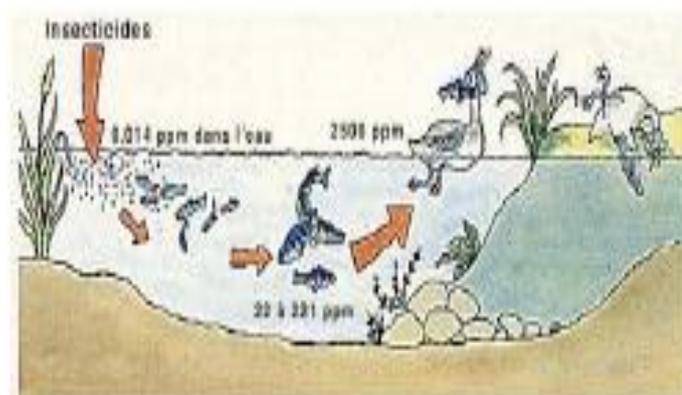


Figure 14: Conséquences de la bioaccumulation après déversement de substances toxiques (insecticides) dans un cours d'eau [40].

➤ TOXICITÉ DES COLORANTS

La toxicité des différents types de colorants (mortalité, effet mutagénique et cancérigène) a été étudiée par plusieurs travaux de recherche aussi bien sur des organismes aquatiques (poisson, algue, bactéries, etc.) que sur les mammifères. En outre, des recherches ont été effectuées pour étudier l'effet des colorants sur l'activité des bactéries aérobies et anaérobies dans des systèmes de traitement des eaux résiduaires. Des études faites sur divers colorants commerciaux ont démontré que les colorants basiques sont les plus toxiques pour les algues [41, 42]. Ce résultat a été prouvé par le test de mortalité des poissons effectués sur 3000 colorants commerciaux où il s'est avéré que les colorants basiques, et plus particulièrement ceux de la famille de triphénylméthane sont les plus toxiques. Par ailleurs, les poissons semblent être relativement sensibles aux colorants acides [43]. D'autre part, la mortalité examinée avec des rats a montré que seulement 1% sur 4461 colorants commerciaux présentent des valeurs de DL50 au-dessous du poids corporel de 250 mg kg⁻¹. Par conséquent, la chance de la mortalité humaine due à la toxicité aiguë de colorant est probablement très basse. Cependant, il faut sensibiliser l'être humain quant à l'utilisation de certains colorants. En effet, il a été prouvé que quelques colorants dispersés peuvent causer des réactions allergiques, dermatologiques, etc. [44]. Par ailleurs, l'effet d'exposition des ouvriers dans l'industrie de textile aux colorants a suscité l'attention. Par conséquent, il s'est avéré que l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques.

La plupart des colorants azoïques ne sont pas initialement toxiques, excepté ceux à groupement amine libre [45]. Cependant, la réduction de ces colorants (rupture de la liaison azoïque) génère la formation des amines aromatiques qui sont connues mutagéniques et cancérigènes. A titre d'exemple. On peut citer : 1,4-phenylenediamine, 1-amino 2-naphtol, benzidine et benzidine substitués comme o-toluidine (Fig I.4-3) [46, 47].

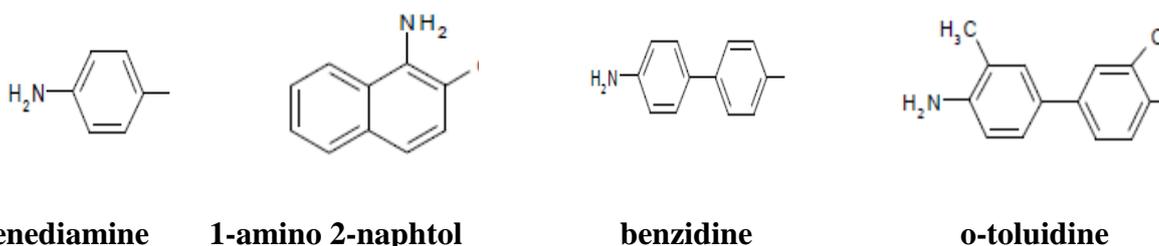


Figure 15: Structures chimiques de quelques amines aromatiques toxiques.

En revanche, la toxicité des amines aromatiques est fortement liée à la structure spatiale de la molécule ou, en d'autres termes, à la position des groupes aminés. Par exemple, le 2-naphtylamine est cancérigène, par contre le 1-naphtylamine est beaucoup moins toxique que le premier [48]. La toxicité des colorants azoïques dépend ainsi de la nature et de la position des substituants. Elle est accrue par la présence de substituants sur le noyau aromatique notamment des groupes nitro (-NO₂) et halogènes (particulièrement Cl). Cependant, la substitution avec des groupes carboxyliques ou sulfonates diminue la toxicité[49]. Des travaux de recherche faisant objet l'étude de l'effet mutagénique et cancérigène des amines aromatiques sulfonées, ont montré qu'ils ne présentent aucun ou un très faible effet génotoxique et cancérigène, contrairement à leurs analogues non sulfonés [50]. En raison des effets mentionnés ci-dessus, il est clair que les colorants, essentiellement les azoïques, ne devraient pas envahir notre environnement. Par conséquent, il est nécessaire de traiter les eaux résiduaires chargées de colorants jusqu'à leur minéralisation totale.

I.5 Elimination des colorants :

Depuis les dernières décennies, différentes techniques physiques, chimiques et biologiques ont été développés pour éliminer les colorants toxiques des eaux usées. Parmi ces méthodes on a :

I.5.1 Les Méthodes physiques :

I.5.1.1 L'Adsorption :

L'adsorption est un phénomène de surface où on peut adsorbé une molécule ou union (liquide ou gaz) et concentré sur la surface d'un solide (adsorbant). Ce processus peut être classé comme physisorption ou chimisorption en fonction de la manière dont les espèces adsorbées sont adsorbées sur la surface de l'adsorbant [51],[52], différentes forces peuvent entrer dans le processus d'adsorption des molécules de colorants telles que les forces des liaisons hydrogènes, les forces de Van Der Waals, les interactions électrostatiques et hydrophobes...ect [39, 53].

L'alumine, le charbon actif, les zéolites et le gel de silice sont couramment utilisés comme adsorbant pour l'élimination du colorant des eaux usées [39, 51], cependant, l'application pratique de ces adsorbants a été limitée par des problèmes liés à leur régénération ou élimination, la production élevée de boues et coût élevé [54, 55]

I.5.1.2 La filtration :

L'une des technologies de traitement de pointe pour éliminer la couleur, la DCO et la salinité des eaux usées est la filtration membranaire [56], telles que l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse. Avec cette approche, le choix du type et de la porosité du filtre dépend de la composition chimique des eaux usées et de la température requise pour le processus [57].

Cependant, les membranes présentent certains inconvénients importants, notamment coûts d'investissement élevés, encrassement du potentiel de la membrane et production de déchets secondaires qui nécessitent le traitement [39, 57]

I.5.1.3 Coagulation-floculation :

Sous le terme de coagulation–floculation, on entend tous les processus physicochimiques par lesquels des particules colloïdales ou des solides en fine suspension sont transformés par des floculants chimiques en espèces plus visibles et séparables (les floccs). Les floccs formés sont ensuite séparés par décantation et filtration puis évacués. Les coagulants inorganiques tels que l'alun donnent les résultats les plus satisfaisants pour la décoloration des effluents textiles contenant des colorants dispersés, de cuve et soufrés, mais sont totalement inefficaces pour les colorants réactifs, azoïques, acides et basiques [58]. Par ailleurs, la coagulation–floculation ne peut être utilisée que pour les colorants fortement solubles dans l'eau.

D'importantes quantités de boue sont formées avec ce procédé: leur régénération ou réutilisation reste la seule issue mais demande des investissements supplémentaires [58].

I.5.2 Les Méthodes chimiques :

Les méthodes d'oxydation chimique permettent la destruction ou la décomposition des molécules du colorant, en utilisant divers agents oxydants, tels que l'ozone (O_3), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le permanganate (MnO_4). Modification de la composition chimique d'un composé ou d'un groupe de composés en présence de ces agents oxydants, pour le rendre susceptible à la dégradation [59].

I.5.2.1 L'ozonation :

L'ozonation est efficace en raison de sa forte réactivité avec de nombreux azo colorants, l'absence d'altération du volume de réaction en raison de son état gazeux et une bonne efficacité d'élimination de la couleur [60]. Cependant sa courte durée de vie, son inefficacité envers les colorants dispersés et insolubles dans l'eau, faible capacité d'élimination de la DCO, ainsi que le coût élevé de l'ozone, limite l'application de cette technique [61].

I.5.2.1.1 Les procédés d'oxydation photochimiques et photocatalytiques (AOP) :

Des agents oxydants tels que O_3 et H_2O_2 ou les photocatalyseurs hétérogènes sont utilisés avec des catalyseurs, tels que TiO_2 , ZnO_2 , Mn et Fe, dans la présence ou l'absence d'une source d'irradiation qui génère (OH) radicaux pour la destruction des colorants polluants dangereux [61-64]

I.5.2.1.2 Méthodes électrochimiques :

L'oxydation Electrochimique est très efficace pour détruire les composés organiques en produisant des produits non dangereux, mais le coût de l'électricité nécessaire a également limité l'utilisation de ce processus [65].

Tableau 2 : Technologies de traitement mises en œuvre pour les colorants synthétiques [11].

Technologie	Avantages	Inconvénients
Coagulation/floculation	Équipement simple Décoloration relativement rapide Réduction significative de la DCO	Nécessite des produits chimiques Fonctionnement onéreux Agents non réutilisables Formation de boue
Filtration sur membranes	Utilisation simple et rapide Pas de produits chimiques Faible besoin énergétique Réduction significative de la couleur	Investissement élevé Traitement spécifique à certains types d'effluents Retraitement du concentré nécessaire avant décharge Encrassement rapide des membranes
Adsorption	Réduction efficace de la couleur Simple	Investissement élevé Lent Régénération coûteuse Nécessite plusieurs types d'adsorbants
Oxydation chimique	Traitement de gros volumes Opération simple Réduction efficace de la couleur Destruction effective des composés Organiques.	Investissements et fonctionnement très coûteux Efficacité limitée pour certains colorants Produits d'oxydation inconnus Production de boue

Chapitre II : Traitement biologique des colorants

Chapitre II: Traitement biologique des colorants

II.1 Introduction :

Le traitement biologique des colorants est souvent mentionnée comme la méthode la plus efficace [66-69], du fait qu'elle est écologique et économique (ne nécessite ni produits chimiques ni énergie) [52]. Le principe de ce traitement est la transformation des colorants toxiques en molécule plus simple et inoffensives (en eau, en dioxyde de carbone et en divers sels de nature inorganique [70] par voie biologique en utilisant plusieurs microorganismes tels que les bactéries, les champignons, les algues, les levures ou des plantes [52, 67] .

II.2 Dégradation des colorants par les champignons :

Les champignons filamenteux sont omniprésents dans l'environnement, habitants des niches écologiques telles que le sol, les plantes vivantes et les déchets organiques, Ils ont La capacité à s'adapter rapidement selon la variation des sources de carbone et d'azote importantes pour leur survie [71].

Les champignons sont capables d'oxyder différents composés chimiques et de dégrader plusieurs colorants, y compris les colorants azoïques et de minéraliser les polluants aromatiques persistants.

La capacité de ces champignons à dégrader une telle gamme de composés organiques résulte de la nature de leurs enzymes ligninolytiques, comme la lignine peroxydase (LiP), peroxydase de manganèse (MnP) et laccase [67, 71]. Récemment plusieurs études ont été consacrées à la dégradation des colorants par les champignons [48, 72, 73]

Tableau 3 : Quelques études sur la biodégradation des colorants par les champignons.

champignons	colorants	Pourcentage d'élimination	Références
Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Penicillium citrinum, and Curvularia lunata.	Les effluents d'une tannerie Brésilienne	74.5% 64% 50% 58%	[48]
Trametes versicolor	Rouge de méthyle Bleu réactif 220	91% 80%	[50]
Cylindrocephalum aurelium RY06	Orange Mordant -1	85%	[74]
Achaetomium strumarium	Rouge Acide 88	99%	[49]

II.3 Dégradation des colorants par les levures :

Dans la littérature, les études portant sur la dégradation des colorants azoïques par des levures sont très limitées malgré que certaines recherches montrent leurs efficacité d'absorber des concentrations élevées des colorants [75]. Bien que seules quelques études aient examiné la capacité de dégradation des colorants par des levures, elles peuvent être utilisées comme substitut à l'élimination des colorants dans l'industrie textile en raison de sa croissance rapide et de leurs capacités d'adaptation dans des conditions environnementales défavorables même à des pH bas [24, 39, 76].

Les Espèces de levures connues pour leurs aptitude à la décoloration sont principalement les ascomycètes, y compris certaines appartenant au genre *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* et *Debaryomyces*. Parmi les basidiomycètes, *Trichosporon* et *Rhodotorula* sont les genres les plus prometteurs [39, 77] .

Le nombre de travaux réalisés sur les levures reste très limité en raison de la difficulté à les manipuler et des inconvénients majeurs qu'elles procurent. En effet, outre la difficulté à les cultiver, l'efficacité des levures vis-à-vis des colorants est très faible (la cinétique de décoloration est lente et

peut prendre plusieurs dizaines de jours) car les levures nécessitent de s'adapter, c'est-à-dire de s'acclimater avant d'aborder la décoloration proprement dite [33].

II.4 Dégradation des colorants par les algues :

Les procédés de traitement à base d'algues sont souvent simple ,les plus économiques et les plus respectueux de l'environnement par rapport aux autres méthodes de traitement conventionnelles [39, 78-80]., les algues ne nécessitent aucune conservation, car leur croissance ne dépend principalement que de la lumière du soleil et du dioxyde de carbone, et ne génère pas de déchet secondaire [39, 81].

Tableau 4: Quelques études sur la dégradation des colorants par les algues :

Algue	Colorants	Pourcentage d'élimination	Références
Poudre verte d'algue monolithique (MAGP), fabriqué à partir de <i>Enteromorpha flexuosa</i>	Crystal Violet Bleu de Méthylène	90.3% 93.4%	[82]
<i>Spirulina platensis</i>	Bleu Indigo	90	[83]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Noir réactif 5 Disperse Red1	≥ 90 ≥90	[26]

II.5 Dégradation des colorants par les Bactéries :

Les bactéries se sont révélées plus efficaces que les autres microorganismes [75]. De nombreuses recherches proposent une large gamme de souches bactériennes pour la décoloration des colorants textiles [24, 76] , dont l'efficacité dépend de leurs adaptabilité et leurs activités dans certaines conditions environnementales [77]. De nombreuses bactéries ont montré la capacité à dégrader les colorants, telles que *Pseudomonas*, *Aeromonas* sp., *Bacillus*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Rhodococcus* sont capables [49, 74, 78, 79, 81, 84].

Contrairement aux champignons et aux actinomycètes, qui dégradent les colorants par voie extracellulaire (implication des LiP, MnP, laccases, etc.), les bactéries agiraient plutôt par voie

intracellulaire. L'action décolorante dépendrait alors non seulement de l'activité enzymatique cytoplasmique mais aussi de la filtration des molécules à travers la membrane cellulaire [33].

➤ **Dégradation par Culture bactérienne pure :**

L'utilisation d'une culture bactérienne pure assure des informations reproductibles, et une interprétation des résultats expérimentaux faciles, elle est également utile pour comprendre les mécanismes détaillés et la cinétique de la dégradation du colorant en utilisant les méthodes biochimiques et moléculaires. Ces méthodes peuvent être utiles pour la maîtrise du système enzymatique en sélectionnant des souches bactériennes ayant la meilleure activité enzymatique [58].

Tableau 5: Quelques études sur la dégradation des colorants par Culture bactérienne pure :

Bactéries	Colorants	Pourcentage d'élimination %	Références
Bacillus cereus	Orange II (OII)/ AO7	52.5	[83]
Micrococcus sp. strain BD 15	Vert de malachite	-	[85]
Aeromonas hydrophila	Noir réactif 5	76	[26]
Bacillus subtilis MTCC 441	Bleu de méthylène	72.44	[49]
Bacillus firmus	Bleu réactif	-	[86]

➤ **Dégradation par des cultures bactériennes mixtes :**

Les souches bactériennes pures ne peuvent pas dégradées les colorants complètement, les cultures bactériennes mixte fournissent de meilleurs résultats de décoloration et de minéralisation en raison de leurs coopération et leurs activité métabolique synergique de la biomasse microbienne [87-89]. Dans le consortium microbien, les souches isolées peuvent attaquées les molécules de colorant par différentes positions, ou peuvent aussi utilisées les métabolites produits par ces souches pour une autre décomposition [90].

Tableau 6: Quelques études sur la dégradation des colorants par des cultures bactériennes mixtes:

cultures bactériennes mixtes (composition)	Colorants	Pourcentage d'élimination %	Références
Bacillus cereus	C.I. Rouge acide 88	78%	[87, 91]
Pseudomonas putida	C.I. Rouge acide 119	99%	
Pseudomonas fluorescens	C.I. Rouge acide 97	100%	
Stenotrophomonas acidaminiphila	C.I. rouge Reactif 120	100%	
	C.I. Bleu acide 113	100%	
	C.I. Marron acide 100	100%	
Aeromonas caviae, Proteus mirabilis Rhodococcus globerulus	Orange Acide 7(AO7)	90%	[92]
Citrobacter freundii (2 strains), Moraxella osloensis, Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas aeruginosa BL22	Noir Mordant 17	95%	[93]
Agrobacterium radiobacter; Bacillus spp.; Sphingomonas paucimobilis, and Aeromonas hydrophila	crystal violet (50 mg/L) and malachite green (50 mg/L)	91% and 99%	[94]

II.5.1.1 Mécanismes de dégradation bactérienne des colorants :

Les mécanismes communs de décoloration par des souches bactériennes sont la réduction de la liaison azoïque, la biosorption, la désamination et la désulfonation [95].

Les liaisons azoïques des colorants sont rompues par les électrons produits lors de l'oxydation d'acétate et l'oxydation des sulfures. Le Clivage asymétrique ou azoréduction est généralement suivie d'une dégradation des amines aromatiques [26].

Dans certains cas, la biosorption des colorants sur les espèces bactériennes est le seul mécanisme dominant [95, 96].

II.5.1.2 Les facteurs affectant la décoloration bactérienne :

Parmi les facteurs affectant l'élimination des colorants par les souches bactériennes on a :

➤ **L'effet du pH :**

Le pH joue un rôle majeur sur l'efficacité de la décoloration, le pH optimal pour la dégradation des colorants est de 6 à 10, neutre à légèrement alcaline, la décoloration diminue rapidement à des valeurs de pH fortement acides ou alcalines. L'adaptation des micro-organismes à des pH variables améliore le processus de traitement des effluents[82].

➤ **L'effet de la température:**

Pour les microorganismes, la température de l'organisme est directement liée à la température ambiante, la cellule microbienne s'adapte aux changements de la température via les mécanismes biochimiques ou enzymatiques. Par conséquent, la température est un facteur primordial pour tous les processus associés à la vitalité microbienne [58].

La température favorable pour l'élimination des colorants est de 35 à 45 ° C. La température optimale améliore la production d'enzymes nécessaire à la décoloration par les bactéries.

La biodégradation diminue à des températures plus élevées en raison de la perte de viabilité cellulaire ou de la dénaturation des enzymes présentes dans la cellule [82].

➤ **L'effet de la concentration initiale :**

Le taux de décoloration diminue avec l'augmentation de la concentration initiale en raison de la toxicité du colorant vis-à-vis des bactéries, les colorants inhibent principalement les activités métaboliques et diminuent la concentration de biomasse [49, 58, 82].

➤ **L'effet de l'ajout de source de carbone et d'azote :**

Les micro-organismes ont besoin de suppléments nutritifs pour une dégradation rapide des polluants [97, 98]. Les sources organiques comme la peptone, l'extrait de levure ou combinaison de glucides et de sources organiques complexes ont été ajoutés pour obtenir un taux de dégradation de colorant élevé et rapide par les cultures pures et par des cultures mixtes. L'efficacité de la dégradation du colorant peut être augmentée par l'ajout de glucose. Le glucose a été signalé comme la source de carbone la plus efficace et la plus facilement disponible pour le métabolisme microbien

des colorants ou des intermédiaires de colorant [98, 99] , le phosphore a été signalé comme un facteur très important de croissance des micro-organismes [97, 100].

II.5.1.3 Dégradation des colorants par des bactéries immobilisées :

L'immobilisation est largement considéré comme une mesure attrayante pour permettre l'utilisation à long terme des isolats en mode continu [26, 96, 97, 99]. L'immobilisation ne simplifie pas seulement la séparation et la récupération des bactéries immobilisées lors d'un fonctionnement continu [94], mais aussi fournissent une densité cellulaire plus élevée permettant ainsi une capacité de dégradation plus élevée. De plus, les micro-organismes immobilisés peuvent résister à plus de stress environnementale, y compris la température, le pH ou les composés toxiques [100].

Les techniques d'immobilisation peuvent généralement être regroupées en méthodes de confinement physiques et chimiques de cellules / enzymes intactes sur un support solide ou une matrice avec le maintien de l'activité catalytique [94, 98]. Les principales méthodes utilisées pour l'immobilisation bactérienne sont l'adsorption physique, le piégeage et l'encapsulation. L'adsorption physique est la rétention de bactéries sur la surface d'un support via des forces de liaison, y compris les forces Van derWaals et les interactions électrostatiques, dans lesquelles les cellules sont exposées directement à la solution de culture [101]. Pour la méthode de piégeage, les cellules bactériennes sont capturées dans des polymères naturels ou synthétiques pour l'immobilisation.

Des polymères naturels tels que l'agar, le chitosane, l'alginate, la cellulose, le collagène, la gélatine, l'alcool polyvinylique et des polymères synthétiques, tels que les éponges en nylon ou en acier inoxydable, une mousse de polyuréthane (PuF), ont été utilisés pour la procédure de fixation [26, 94] L'encapsulation consiste à retenir les bactéries dans une membrane semi-perméable qui permet le libre transfert de nutriments et de substrats entre les matériaux de support et le milieu de culture [102].

Tableau 7 : Quelques études sur la dégradation des colorants par des cultures bactériennes immobilisées:

cultures bactériennes	Support immobilisant	Colorants	Pourcentage d'élimination %	Références
Aeromonas eucrenophila	Nanofibres d'acétate de cellulose électrofilée.	Bleu de Méthylene	95	[103]
Clavibacter michiganensis				
Pseudomonas aeruginosa				
Consortium de Bacillus sp., Aeromonas sp.et Alcaligenes sp.	Morceau de coquillages	violet Acide -17	91	[104]
Pseudomonas sp.	Matrices de silice	noir de remazol	75	[105]
		orange de méthyle	83	
		orange de benzyle	79	
Bacillus sp	polyvinyl alcohol–calcium alginate–activated carbon beads jf4	Bleu reactif 19	100	[106]
Pseudomonas guariconensis	calcium alginate	Reactive Red 120	91	[107]

Chapitre III : La microflore des produits agroalimentaire

Chapitre III: La microflore des produits agroalimentaire

III.1 Introduction :

Les microorganismes sont présents dans les écosystèmes naturels comme l'air, le sol et l'eau. Ils sont également présents sur l'homme lui-même et sur tous les êtres vivants animaux et végétaux. Les fruits et légumes frais constituent un milieu favorable à la croissance des microorganismes.

Ils sont à l'origine d'intoxications alimentaires suite à la consommation de produits contaminés par des germes pathogènes. Ils sont également sensibles à de nombreux microorganismes d'altération tels que les bactéries pectinolytiques, les bactéries Gram négatif saprophytes, les bactéries lactiques et les levures[108].

III.2 Quelques bactéries indésirables dans les produits agroalimentaires [108] :

- ***Germes aérobies mésophiles:***

Ensemble des bactéries, des levures et des moisissures se développant à une température de 20°C à 45°C en présence d'air.

Un nombre élevé de germes aérobies est un indicateur d'une contamination ou d'une multiplication due par exemple à une conservation inappropriée (stockage à température ambiante, temps trop long de refroidissement).

Aliments contaminés Tous les aliments périssables.

- ***Enterobactériaceae*** : Les Enterobacteriaceae se trouvent en grande quantité dans les intestins de l'homme et des animaux, mais certaines espèces sont également présentes dans l'environnement.

Leur présence signifie que le produit n'a pas été assez cuit ou a été manipulé dans des conditions non hygiéniques après cuisson.

Aliments contaminés Les produits crus sont souvent naturellement contaminés par ces bactéries. En revanche, les produits cuits doivent en être exempts.

- ***Bacillus cereus*** : *Bacillus cereus* est une bactérie présente dans la terre et la poussière et qui peut former des spores la rendant plus résistante à l'environnement.

Aliments contaminés Principalement présente dans les produits secs, tels que les épices, les produits céréaliers et les légumes séchés. On peut également en trouver dans le lait et les produits laitiers et particulièrement dans le riz.

- ***Bactéries épiphytes*** : Bactéries qui se trouvent à la surface des feuilles des végétaux.
- ***Clostridium perfringens*** : Clostridium perfringens est une bactérie principalement répandue dans la terre et dans l'intestin de l'homme et des animaux. Cette bactérie se multiplie en l'absence d'oxygène, peut produire des toxines et former des spores.

Aliments contaminés Les produits cuits, en particulier les préparations de viande cuite et hachée à manger froides.

- ***Salmonella SPP.*** : Les salmonelles se trouvent dans les intestins des animaux et de l'homme. Il existe des porteurs sains qui ne développent pas la maladie, mais qui peuvent excréter des germes.

La contamination se produit par des mains mal lavées, par des viandes crues ou volailles mal éviscérées, par des oeufs mal cuits ainsi que par des insectes ou des rongeurs.

Aliments contaminés Les produits carnés, principalement les volailles ainsi que les oeufs, les préparations lactées, les produits de la mer et les végétaux

- ***Campylobacter SPP. Thermotolerants*** : les réservoirs des campylobacter sont principalement les volailles. Les contaminations croisées sont possible via des mains mal lavées ou des surfaces et instruments de cuisine, lors de manipulation de volailles crues.

Aliments contaminés Les viandes de volaille et le lait cru.

- ***Listeria monocytogenes (Lm)*** : La listeria est une bactérie que l'on trouve partout. Elle est très résistante, peut survivre aux traitements de nettoyage-désinfection et ainsi persister dans les ateliers de production de l'industrie agro-alimentaire. Les contaminations étant essentiellement dues à des denrées d'origine animale.

Aliments contaminés Produits laitiers et charcuteries et poissons fumés.

- ***Microorganismes pectinolytiques*** : bactéries dégradant la pectine, constituant majeur des parois végétales.

III.3 La betterave rouge et sa microflore:

III.3.1 Introduction :

La Betterave rouge (*Beta vulgaris*) est un légume traditionnel et populaire dans de nombreuses régions du monde. La betterave rouge est cultivée pour ses grandes racines, bien que les feuilles soient également utilisables. Il est particulièrement riche en fibres, protéines et minéraux, tels que le sodium, le potassium, le calcium et le fer ainsi qu'en glucides, mais avec une valeur calorique modérée [109]. Il a une teneur importante en vitamines B (B1, B2, B3 et B6) ainsi qu'en acide folique.

Les betteraves rouges sont consommées soit fraîches, soit après traitement thermique ou fermentation. Les composés phénoliques solubles et associés à la paroi cellulaire ainsi que les bétalaïnes, les pigments de la betterave rouge responsables de sa teinte pourpre rougeâtre, sont des composés bioactifs [110], étant leur capacité antioxydante bénéfique pour la santé humaine;[109, 111-114].

III.3.2 La microflore de la betterave :

Le jus de betterave fraîchement pressé conserve la plupart des bétacyanines ainsi que son goût et son odeur frais, mais peut être une source de microflore indésirable. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, et *Listeria innocua* ont été trouvés dans ces types de jus [115, 116]. Le jus de betterave non pasteurisé reste un réservoir prodigieux de nombreux micro-organismes, qui sont normalement présents à la surface des légumes-racines qui sont directement exposés au sol. Les Lactocoques, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et Entérocoque sont isolés aussi de différents légumes tels que la carotte, le chou, le concombre et la tomate[116, 117]. .

Les principales sources de microflore indésirable, y compris les microorganismes pathogènes, sont les sols contaminés, l'eau d'irrigation et les engrais organiques. En dehors de cela, les émetteurs de micro-organismes sont les animaux, les oiseaux et les insectes.

Le légume-racine peut être contaminé par des micro-organismes tel que les bactéries aérobies et anaérobies, les bactéries sporulantes, les coliformes et les cocci du genre *Micrococcus* [116, 118].

Tableau 8: Microflore de la betterave cru [116]

<i>Betteraves crues</i>	<i>Bactérie mésophile aérobie [ufc/g]</i>	<i>Acide lactique Bactéries [ufc/g]</i>	<i>Levures [ufc/mg]</i>	<i>β Glucuronidase -Positif Escherichia coli [ufc/mg]</i>	<i>Listeria monocytogènes [ufc/g]</i>	<i>References</i>
Betteraves non lavées	$3.1 \times 10^6 - 2.0 \times 10^8$	-	$6.3 \times 10^4 - 1.1 \times 10^6$	<10	-	[119]
Betteraves non lavées (fermes biologiques)	$6.2 \times 10^6 - 4.7 \times 10^8$	-	$1.2 \times 10^5 - 3.4 \times 10^6$	<10	-	[119]
Betterave Lavé et épluché	1.2×10^2	1.3×10^3	3.3×10^1	-	-	[120]

Etude expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

Etude expérimentale :**Chapitre I: Matériels et méthodes****I.1 Les colorants utilisés :**

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la dégradation de deux colorants cationiques : le bleu de méthylène (BM) et le vert de malachite, obtenues de panreac Ltd

I.1.1 Le bleu de Méthylène :

Le bleu de méthylène, ou chlorure de méthylthioninium, est un dérivé de la phénothiazine à la fois médicament et colorant dont l'action repose sur les propriétés rédox. Il a été préparé pour la première fois par Heinrich Caro en 1876[121]. C'est un solide cristallisé inodore soluble dans l'eau et, dans une moindre mesure, dans l'éthanol. À l'état pur, il se présente sous la forme d'une poudre vert foncé ; on le trouve commercialement également sous forme d'un sel double avec le chlorure de zinc, de couleur brune.

- **Propriétés physico-chimiques :**

Tableau 9: Résumé des principales caractéristiques physico-chimiques du Bleu de Méthylène [122]

Dénomination	Bleu de méthylène ou chlorure de tétraméthylthionine, Basic blue 9 (C.I.)
Appellation chimique	Chlorure de 3,7- bis (diméthylamino) phénazathionium
Famille	Colorant basique
Formule brute	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ ClS
Masse molaire (g/mol)	319,85
Solubilité dans l'eau (g/l) à 20°C	40
Point de fusion (°C)	180
λ_{\max} (nm)	664

- Structure chimique du bleu de méthylène:

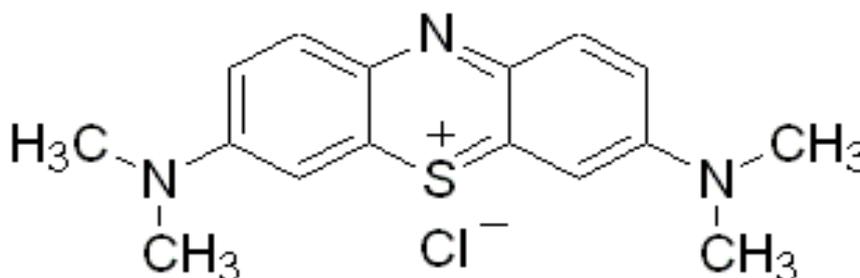


Figure 16: structure du Bleu de Méthylène

I.1.2 Le vert de Malachite :

Le vert de malachite (ou vert d'aniline, ou vert de diamant B) est un produit chimique principalement connu pour ses qualités de colorant bleu-vert.

Le nom de « Vert de Malachite » provient du nom d'un carbonate minéral : la malachite.

- Propriété physico- chimique du vert de Malachite :

Tableau 10: propriétés physico-chimique du VM

Nom générique	Vert de malachite
Nom chimique	4-[(4-diméthylaminophényl)-phényl-méthyl]- <i>N,N</i> -diméthyl-aniline
Formule chimique	$C_{23}H_{25}ClN_2$ [Isomères](sel)
Poids moléculaire (g/mol)	$364,911 \pm 0,023$ g/mol
pKa	6
Solubilité	110 g /L H ₂ O (24°C forme oxalate)

- Structure chimique :

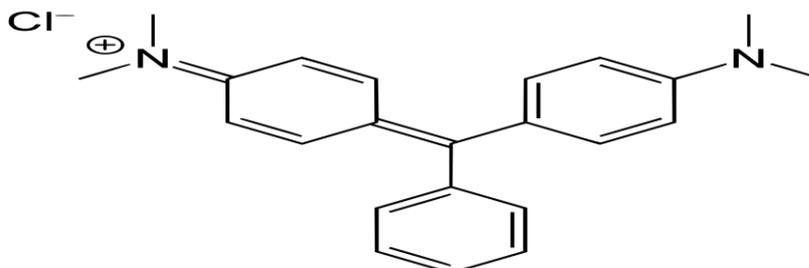


Figure 17: La structure du vert de malachite

I.2 Microorganismes et milieu de culture :

Les bactéries utilisées dans cette étude sont isolées à partir de la chair et l'épluchure de la betterave rouge cultivée dans la région de Boumerdes et récolté en automne, par la méthode de suspension –dilution après avoir été mis dans l'eau physiologique à 0.9% et ensemencé sur la gélose nutritive additionnée au bleu de Méthylène.

Les bactéries capables de dégradées le bleu de méthylène BM ont été cultivées dans un bouillon nutritive constitué d'eau, de peptone, d'extrait de levure, d'extrait de viande et de NaCl pendant 24h à une température de 37°C.

- **L'alginate de sodium :**

L'alginate ou polymannuronate sodique, de formule $(C_6H_7NaO_6)_n$ est un co-polymère naturel extrait des algues brunes [123], Il se présente sous forme de poudre blanche à blanc crème, inodore et sans saveur, très soluble dans l'eau. Il a la capacité de former des billes lors de la gélification.

L'alginate est largement utilisé dans le domaine de l'immobilisation en particulier dans l'élimination des polluants en solutions aqueuses.

La poudre d'alginate de sodium (PM = 173 kDa) a été obtenue de Sigma-Aldrich.

Tableau 11: Propriétés physico-chimique du l'alginate de sodium.

Nom générique	Polymannuronate sodique, calginate
Formule chimique	$C_6H_7NaO_6$
Poids moléculaire (g/mol)	$198,1059 \pm 0,0071g/mol$

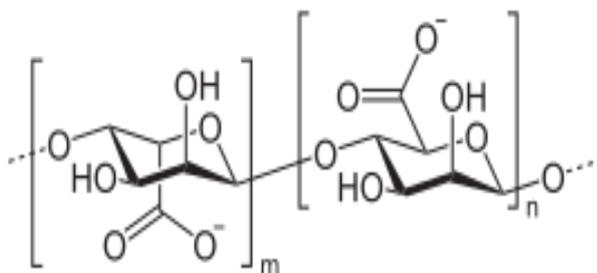


Figure 18: La formule chimique de l'alginate de sodium

I.3 Matériels utilisés :

Appareil	Marque
Microscope optique	motic
Autoclave	Raypa
Spectrophotomètre UV-Vis	spectrophotomètre shimadzu UV-1800.
pH mètre	WTW labol
Etuve microbiologique	Memmert
spectroscopie infrarouge	EQUINOX-55 FT-IR-ATR

I.4 Méthode :**I.4.1 Sélection des souches :****➤ Préparation de la betterave :**

La betterave est bien lavée avec de l'eau distillée et stérilisée, épluchée avec un couteau stérilisé trempés dans d'éthanol 95% puis enflammé dans la flamme d'un Bec Bunsen.

20g de la chaire de la betterave et 20g de l'épluchure sont mis chacun dans 100 ml d'eau physiologique à 0.9% stérile.



I.4.1.1 Technique d'isolement des bactéries :

➤ **Suspension-dilution :**

La méthode de suspension-dilution utilisée par Pochon et Tardieux [124, 125] est basée sur trois étapes :

On répartit 9ml d'eau distillée dans des tubes à essais qui sont ensuite stérilisés dans l'autoclave à 120°C pendant 20min ;

On ajoute 1 ml des solutions déjà préparées à l'un des tubes pour obtenir la dilution 10^{-1} ;

On prélève 1ml de la dilution 10^{-1} et on le transporte dans un second tube contenant 9ml de diluant pour avoir la dilution 10^{-2} , on continue de la même façon pour obtenir des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} .

Les tubes sont agités d'une manière régulière avant chaque prélèvement.

➤ **Ensemencement :**

Une quantité de 0.1 ml de chaque dilution a été prélevée et ensuite étalée sur la surface des milieux de cultures préparés (gélose + bleu de méthylène) dans les boîtes de Pétri.

L'incubation des boîtes de Pétri est assurée à 30°C pendant 48h.

➤ **Choix des isolats :** Le choix des isolats est basé sur la dominance des bactéries présentes dans les différentes dilutions et sur la dégradation du bleu de méthylène présent dans le milieu de culture.

I.4.2 L'identification des bactéries :

L'identification des bactéries isolées et choisies est réalisée par le spectrographe de masse Maldi-Tof ou Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time –Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) de marque MALDI -TOF Biotyper - CM de Bruker Daltoni (Centre de Recherches Scientifiques et techniques en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC)).

La spectrographie de masse Maldi-Tof est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur « temps de vol » (proportionnel à leur masse et à leur charge). Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation (le laser) suivie d'un analyseur qui sépare les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal [126].



Figure 19: MALDI -TOF Biotyper - CM de Bruker Daltoni

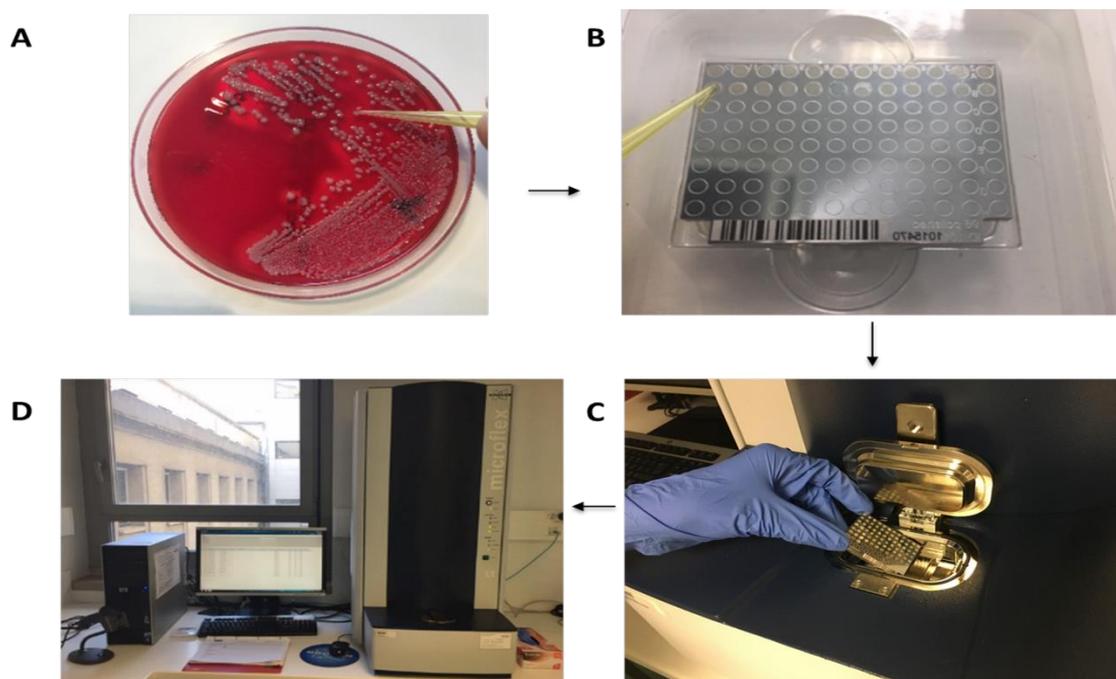


Figure 20: Les étapes de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

I.4.3 Dégradation des colorants par les bactéries choisies BC1, BP1 et BP2 et le Micro-mélange :

I.4.3.1 Préparation des pré-cultures :

On inocule les souches bactériennes isolées dans 20ml de bouillon nutritif BN (préparer à base d'eau, de peptone, d'extrait de levure, d'extrait de viande et de NaCl) pour préparer des pré-cultures de BC1, BP1 et BP2, aussi on prépare un consortium bactérien de l'ensemble des bactéries choisies (BC1+BP1+BP2) en suite on les incube pendant 48h à une température de 37°C.

I.4.3.2 La dégradation des colorants :

La dégradation des colorants a été constatée par la mesure de l'absorbance des solutions prise à différents intervalles de temps à la longueur d'onde $\lambda = 664$ nm pour le BM et $\lambda = 620$ nm pour le VM à l'aide du spectrophotomètre shimadzu UV-1800.

La dégradation du colorant est mesurée par le pourcentage d'élimination du colorant en utilisant le spectrophotomètre UV, le pourcentage d'élimination est calculé par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'élimination} = \frac{\text{DO initiale} - \text{DO finale}}{\text{DO initiale}} \times 100$$

➤ Analyse structurale par spectroscopie infrarouge (I R T F)

La spectroscopie IR est l'une des méthodes spectrales. Elle permet l'identification des groupements fonctionnels.

Les analyses de spectroscopie I.R ont été effectuées sur un spectromètre modèle Thermo Scientific Nicolet IS 10 du module Smart ITR ATR Thermo Scientific. L'analyse a été réalisée avec 40 balayages et 2 cm^{-1} de résolution, dans la page de 4000 à 600 cm^{-1} (laboratoire de recherche Scientifiques).

I.4.3.3 Influence de la concentration initiale sur la dégradation des colorants:

L'effet des concentrations initiales des colorants a été étudié en variant la concentration initiale entre 5mg/l et 100 mg/l pour BM et entre 5 mg /l et 50 mg/l pour le vert de malachite, en introduisant les pré-cultures obtenues à 200 ml de colorant d'un pH de 7 et une température d'incubation de 37°C.

I.4.3.4 Influence de la température sur la dégradation des colorants :

L'effet de la température d'incubation sur la dégradation du Bleu de méthylène et du vert de malachite a été déterminé dans différentes températures d'incubation variant de 4° à 45°C , avec un pH de 7 et une concentration initiale de 10 mg/l.

I.4.3.5 Influence du pH sur la dégradation du bleu de Méthylène :

L'influence du pH sur l'élimination du BM a été étudiée sur une plage de pH de 3 à 11), à une température d'incubation de 37°C et une concentration initiale de 10mg/l.

Le pH a été ajusté par addition de solution de NaOH (0.1 M) ou de HCl (0.1 M) (Aldrich, 99%).

I.4.3.6 Influence de l'ajout de la source de carbone et de l'azote sur la dégradation des colorants :

L'effet de l'ajout de la source de carbone et de la source d'azote a été déterminé par l'ajout de 1g soit de glucose, d'amidon ou de lactose comme source de carbone, et pour la source d'azote l'ajout de 1g soit de Sulfate d'ammonium, Chlorure d'ammonium ou l'Urée aux solutions de BM et VM de concentration 10mg/l, un pH de 7 et une température d'incubation de 37°C.

I.4.4 L'étude cinétique de dégradation des colorants par les différentes bactéries :

I.4.4.1 L'ordre des réactions :

La cinétique des processus de décoloration fournit des informations utiles concernant l'efficacité de la dégradation enzymatique. Les données de décoloration obtenues à partir des résultats expérimentaux ont été analysées par les équations du modèle cinétique de zéro, premier et second ordre, données dans le tableau suivant à une température d'incubation de 37°C, un Ph de 7 et des concentrations initiaux de 5, 10, 20 et 50 mg/l , la lecture de l'absorbance a été effectuée en double à des intervalles de 1h pendant 6 heures et les valeurs moyennes ont été calculées.

Tableau 12 : Modèles cinétiques de zéro, premier et second ordre [127]

Modèle cinétique	Forme linéaire	Forme graphique	Constante de vitesse
Ordre zéro	$C_t = C_0 - k_0t$	$C_t = f(t)$	k_0
Premier ordre	$\ln(C_t) = k_1t + \ln(C_0)$	$\ln(C_t) = f(t)$	k_1
second ordre	$1/C_t = 1/C_0 + k_2t$	$1/C_t = f(t)$	k_2

Où C_t : la concentration de colorant dans la solution (mg l^{-1}) à un temps t
 C_0 : la concentration initiale du colorant dans la solution (mg l^{-1}).

I.4.4.2 Détermination de la vitesse maximale de dégradation du colorant (V_{\max}) et de la constante de vitesse de décoloration (K_m) :

En 1913 Michealis et Menten ont établi une théorie générale du mécanisme d'action des enzymes et de la cinétique enzymatique. Cette théorie admet que l'enzyme E réagit dans

une première étape avec le substrat(S) pour former la combinaison(E-S), ce dernier se décompose dans une deuxième étape pour régénérer l'enzyme et libérer le produit(P) qui consiste en :



➤ **Equation de Michaelis –Menten :**

L'équation de Michaelis-Menten est donnée comme suit [127, 128]:

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

V_{max} : la vitesse maximale de consommation du substrat (BM, MG) en mg l⁻¹ h⁻¹

V : la vitesse de consommation du substrat en mg l⁻¹ h⁻¹

S : la concentration du substrat en mg l⁻¹

K_m : la constante de Michaelis -Menten en mg l⁻¹, K_m est égale à la concentration du substrat lorsque la vitesse de réaction est la moitié de la vitesse maximale.

C'est l'équation de base de la cinétique enzymatique, elle décrit une hyperbole équilatère qui passe par l'origine et dont l'asymptote, lorsque s tend vers ∞, vaut V_i= V_{max}.

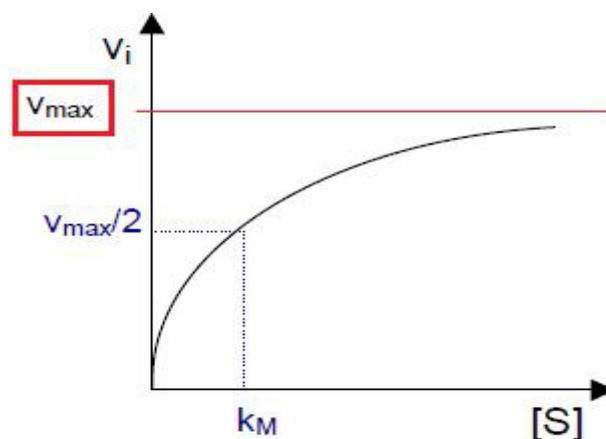


Figure 21 : Représentation graphique de l'équation Michaelis-Menten

❖ **Méthodes de détermination de km et vmax:**

Expérimentalement V_{max} et K_m se déduisent de la V_i de la réaction dans une gamme de concentrations initiales de substrat.

Un grand nombre de méthodes de détermination de ces deux paramètres, tant graphiques que numériques, ont été mises au point:

1) Méthode arithmétique:

$$\text{Si } V = \frac{V_{\max}}{2} \longrightarrow K_m = [S]$$

K_m est égal à $[S]$ lorsque la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale $K_m = [S]$

2) Méthodes graphiques

Une hyperbole est difficile à tracer manuellement.

-Des erreurs sur l'estimation de la V_{\max} sont possibles.

Pour simplifier la représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN peut être transformée algébriquement en d'autres relations, des transformations les plus utilisées consistent simplement à prendre l'inverse de l'équation de Michaelis-Menten.

A. Méthode graphique de Lineweaver-Burk :

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Son inverse est} \quad \frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} \cdot [S]}$$

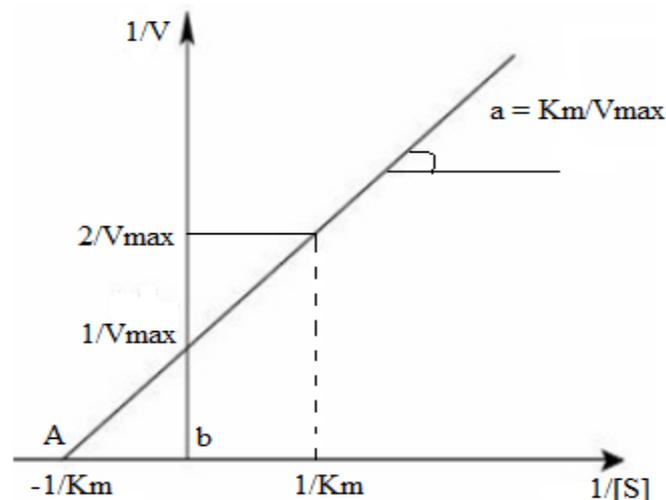
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S]K_m}{V_{\max} \cdot [S]} \quad \text{Cette équation se simplifie en :}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

C'est l'équation Lineweaver-Burk [127], qui représentée par une ligne droite de la forme :

$$Y = a x + b$$

Où $1/V = f(1/[S])$ sa pente $a = K_m/V_{\max}$ son ordonné d'origine : $b = 1/V_{\max}$



La détermination de la valeur de la constante de Michaelis (K_m) est donc immédiate, lorsque la droite de Lineweaver-Burk est tracée.

-pour cette présentation graphique, il suffit de 2 à 3 points pour la tracer.

-Cette méthode est très utilisée et importante sur le plan pratique : permet donc les calculs de V_{max} et K_m .

- Elle permet aussi la mise en évidence simple des inhibiteurs de la réaction enzymatique.

B. Représentation Eadie-Hofstee :

Cette représentation fût publiée par George Eadie en 1942 et Baren Hofstee en 1959 :

A partir de l'équation de Michaelis-Menten $V = V_{max}[S] / K_m + [S]$

On divise le numérateur et dénominateur par $[S]$ et obtient l'équation suivante[128] :

$$V = K_m \left(\frac{V}{S} \right) + V_{max}$$

Un tracé de V en fonction de (V/S) donne une ligne droite avec une pente de K_m et une ordonnée à l'origine V_{max} .

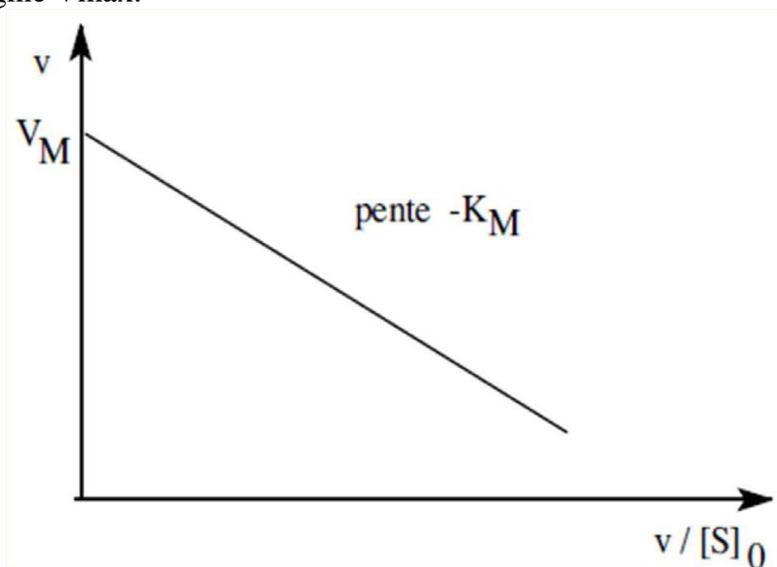


Figure 22 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee

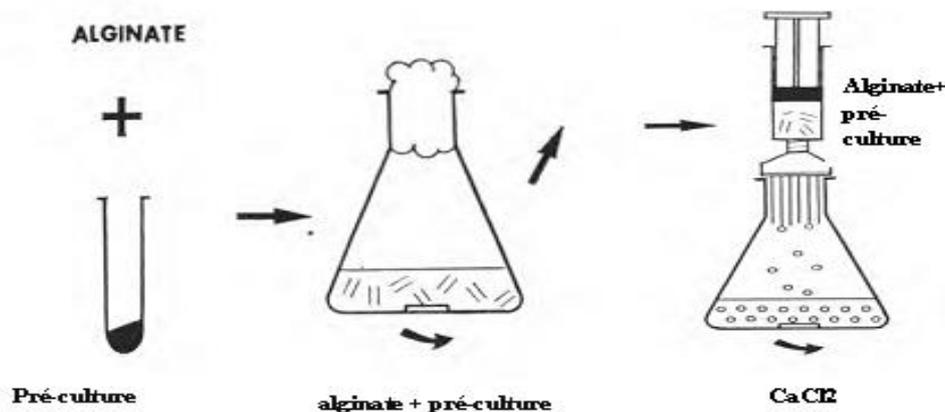
Cette représentation est une droite de pente $-K_m$ et coupe l'axe des V au point V_{max} et l'axe de $V/[S]$ au point V_{max}/K_m .

La détermination de la vitesse maximale de consommation des colorants BM et MG (V_{max}) et de la constante de vitesse de décoloration (K_m) ont été étudiée à 37°C et à pH 7, un temps d'incubation de 25 h et des concentrations initiales des colorants BM et MG allant de 5 mg/L à 50 mg/L.

I.4.5 Dégradation des colorants (BM et VM) par les bactéries et le consortium immobilisés :

➤ Immobilisation des bactéries :

Nous avons préparé des pré-cultures bactériennes à partir de BC1, BP1, BP2 et du micro-mélange, ensuite on a mélangé 17,5 ml de ces cultures avec 87,5 ml d'eau distillée stérile et mis sous agitation pendant 10 min. Nous avons ajouté par la suite 3,063 g d'alginate de sodium (Na) et nous avons laissé sous agitation jusqu'à ce que le mélange devienne visqueux. A l'aide d'une seringue nous avons transvasé le contenu dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) 0,12 M stérile et sous agitation. Une fois les cellules bactériennes immobilisées, nous les avons conservé dans 100 ml de chlorure de calcium CaCl_2 5 mM [129].



➤ Influence de l'immobilisation sur la dégradation des colorants :

L'effet de l'immobilisation sur l'élimination du BM et VM par BC1, BP1, BP2 et le consortium immobilisés en fonction du temps est déterminé en mesurant la densité optique des solutions à une température de 37°C , un pH de 7 et une concentration initiale de 10 mg/l.

➤ Influence du nombre de billes des bactéries encapsulées sur la dégradation du bleu de méthylène et du vert de malachite :

L'influence du nombre de billes a été étudiée par la même procédure que précédemment en variant le nombre de billes entre 10 et 100 billes. Le pH initial est toujours à 7 et la température de 37°C et une concentration initiale de 10mg/l.

➤ **Influence de l'agitation sur la dégradation du BM et VM par les bactéries et le consortium immobilisés :**

L'effet de l'agitation sur la dégradation des colorants est déterminé à une température de 37°C, un pH de 7 et une concentration des colorants de 10mg/l on exposant les solutions à a une agitation de 100tr/min.

Chapitre II : Résultats et discussion

Chapitre II: Résultats et discussion

II.1 Isolement des bactéries:

La méthode des suspensions dilution a permis d'obtenir un nombre important des isolats avec la gélose nutritive additionnée de bleu de méthylène, le suivi de la décoloration par des souches bactériennes isolées à partir de la peau et de la chair de la betterave rouge pendant 72h a donné les résultats indiqués dans le tableau13.

Tableau 13: Décoloration de la gélose nutritive additionnée du colorant.

Souches Bactériennes	A partir de la peau de la betterave					A partir de la chair de la betterave				
	P1	P2	P3	P4	P5	C1	C2	C3	C4	C5
Décoloration	++	++	-	+	-	+	-	-	-	-
++ : Forte			+ : Moyenne			- : Faible				

A partir du tableau 13 on a choisi trois souches bactériennes BP1, BP2 et BC1, ces trois souches ont montrées une bonne croissance et une meilleure décoloration du bleu de méthylène.



choix des isolats de la peau de la betterave rouge



choix des isolats de la chair de la betterave rouge

Figure 23: choix des isolats de la peau et de la chair de la betterave rouge.

II.2 Identification des bactéries :

L'identification des bactéries déjà choisies par la spectrographie de masse Maldi-Tof a permis d'identifier la bactérie BC1 comme *Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca CIP 106718T HAM*, la bactérie BP1 comme *Acinetobacter Johnson II* et la bactérie BP2 comme *Bacillus weihenstephanensis*.

II.2.1 La bactérie *Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca* : est une bactérie Gram-négative non sporulée en forme de bâtonnet avec un ou plusieurs flagelles polaires [130].

Pseudomonas chlororaphis est une bactérie du sol hétérotrophe que l'on peut trouver dans la rhizosphère, la phyllosphère et les sédiments environnants [131, 132].

II.2.2 *Acinetobacter Johnson II* :

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des coco-bacilles Gram-négatifs, immobiles et non fermentaire. La plupart des souches de ces organismes se développent à température de 20°C à 37°C. Les colonies sont généralement non pigmenté, jaune pâle ou blanc grisâtre, les bactéries sont strictement aérobies, catalase positive et oxydase négative [133, 134].

II.2.3 *Bacillus weihenstephanensis* : sont des bactéries bacilles à Gram-positif, Aérobie ou anaérobies facultatifs, ce sont des bacillus cereuse [135-137]

Caractéristiques	<i>B.weihenstephanensis</i>
T° min de croissance	5°
T° max de croissance	37°
Catalase	+
Oxydase	-
mobilité	+
Croissance en anaérobiose	+

II.3 Elimination du Bleu de Méthylène BM par les bactéries:

II.3.1 Influence de la concentration initiale sur la dégradation du BM :

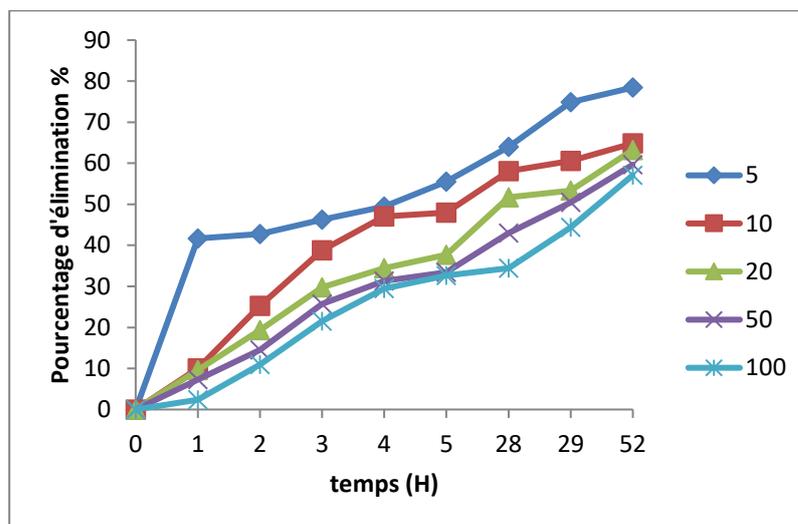


Figure 24: Le taux de dégradation du bleu de méthylène en fonction du temps et de la concentration initiale du colorant par la bactérie BC1 dans une température d'incubation de 37°C et un pH de 7 .

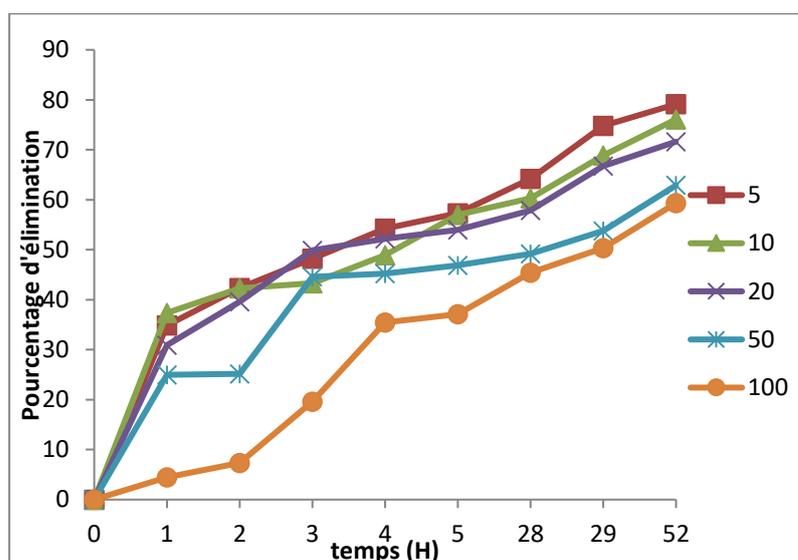


Figure 25 : Le taux de dégradation du bleu de méthylène en fonction du temps et de la concentration initiale du colorant par la bactérie BP1 dans une température d'incubation de 37°C et un pH de 7 .

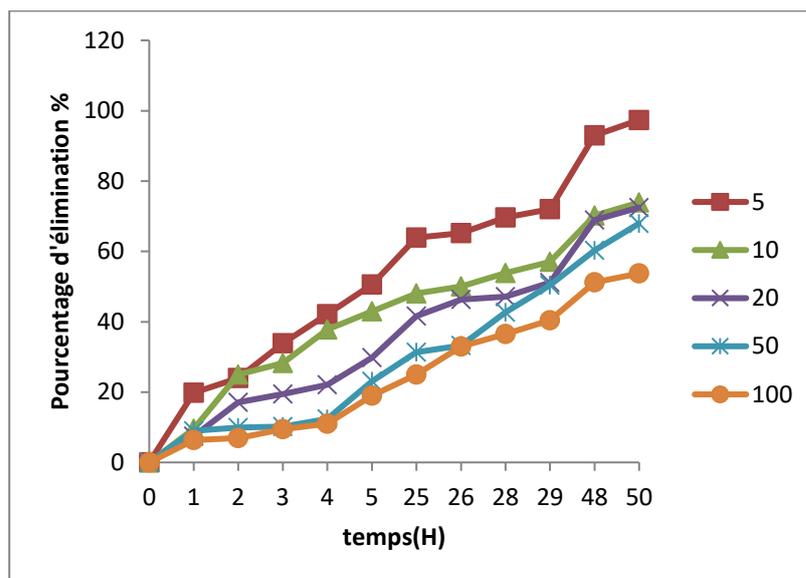


Figure 26 : Le taux de dégradation du bleu de méthylène en fonction du temps et de la concentration initiale du colorant par la bactérie BP2 dans une température d'incubation de 37°C et un pH de 7 .

Les Figures 24, 25 et 26 représentent le taux de dégradation du bleu de méthylène par les bactéries BC1, BP1 et BP2 respectivement en fonction de la concentration initiale et du temps dans une température d'incubation de 37°C et un pH de 7 , ils ont montrés que les trois bactéries ont une grande habilité à dégrader le BM qui est un colorant difficilement biodégradable. La Bactérie BP2 a donné des meilleurs résultats que les Bactéries BC1 et BP1 (97% d'élimination du BM pour une concentration initiale de 5mg/l pendant 50 h d'incubation par la bactérie BP2 par rapport 80% par BP1 et 70% par BC1).

Les résultats ont montrés que plus la concentration initiale du BM augmente plus le pourcentage d'élimination diminue 70, 80 et 97% d'élimination du BM pour une concentration initiale de 5mg/l par contre on a un taux d'élimination de 59 par BC1, 63 par BP1 et 70% par BP2 pour une concentration initiale de 100%. Ces résultats sont similaires à celles trouvée par P Shah 2012[138], BANDARY HUSSAIN et al 2016[139] et par Kilany 2017[84]. Delà on peut dire que la concentration du colorant influe sur l'activité microbienne par une combinaison de facteurs y compris la toxicité du colorant à des concentrations élevées (l'effet antiseptique du BM) [138].

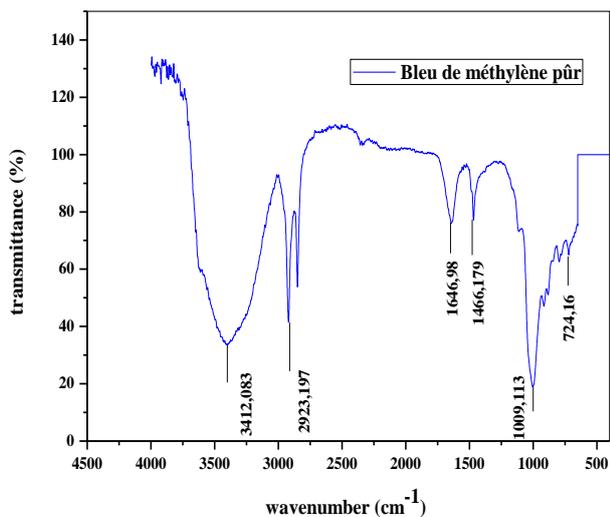


Figure 27 : Spectre FTIR du Bleu de Méthylène pur

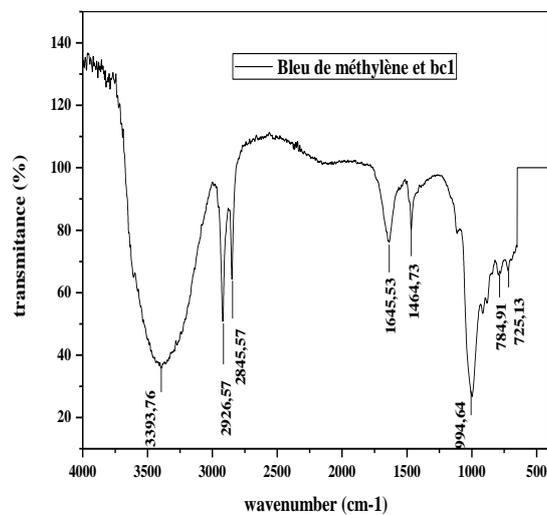


Figure 28 : Spectre FTIR du Bleu de Méthylène (Cinit=10mg/l) après dégradation par BC1.

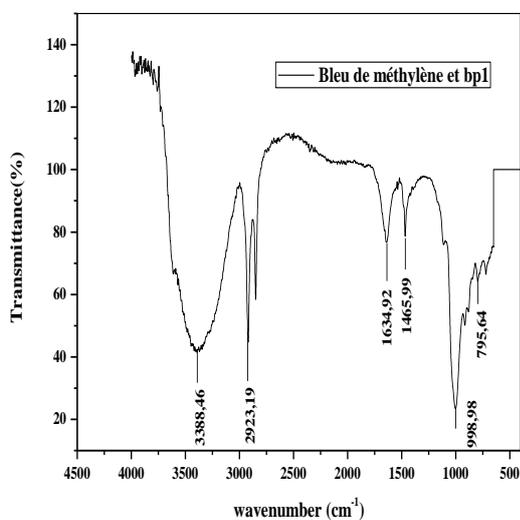


Figure 29: Spectre FTIR du Bleu de Méthylène (Cinit=10mg/l) après dégradation par BP1.

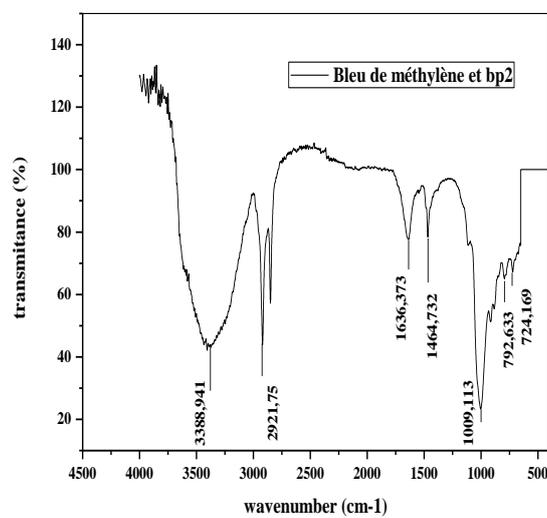


Figure 30: Spectre FTIR du Bleu de Méthylène (Cinit=10mg/l) après dégradation par BP2

Le tableau ci-dessous nous fournit les fréquences calculées accompagnées de celles théoriques des bandes infrarouges du colorant bleu de méthylène avant et après dégradation par les trois bactéries après 50 h d'incubation :

Tableau 14 : Les fréquences du spectre IR du Bleu de Méthylène avant et après dégradation.

Bleu de méthylène pur	Fréquence calculée			Fréquence théorique cm^{-1}	v Vibration	Groupement chimique
	BM+BC ₁	BM+BP ₁	BM+BP ₂			
724,6	725.13	713.56	724,169	670 -730	C-H 1ère bande	aromatique disubstitué méta
797.36	784.91	795,64	792,633	750 - 810	C-H 2ème bande	liaison aromatique disubstitué méta
1009,113	994.64	998,98	1009,113	1220-1000	C-N	Amine
1466,179	1464.73	1465,99	1464,732	1600-1450	C=C	Aromatique
1646,98	1645.53	1634,92	1636,373	1550-1650	N-H	Amines primaires
2840.65	2845.57	2847.65	2848.45	2850 -3000	C-H	-
2923,197	2926.57	2923,19	2921,75	2920-2950	C-H	CH3 asymétrique
3412,083	3393.76	3388,46	3388,941	3500-3100	N-H	Amine

On comparant les spectres IR du Bleu de Méthylène avant (Fig 27) et après dégradation (Fig 28, 29 et 30) et selon le tableau N° 14 on constate des changements importants dans toutes les fréquences du spectre, ce qui indique clairement la biodégradation de tous les composants du bleu de méthylène.

II.3.2 Influence de la température sur la dégradation du bleu de Méthylène :

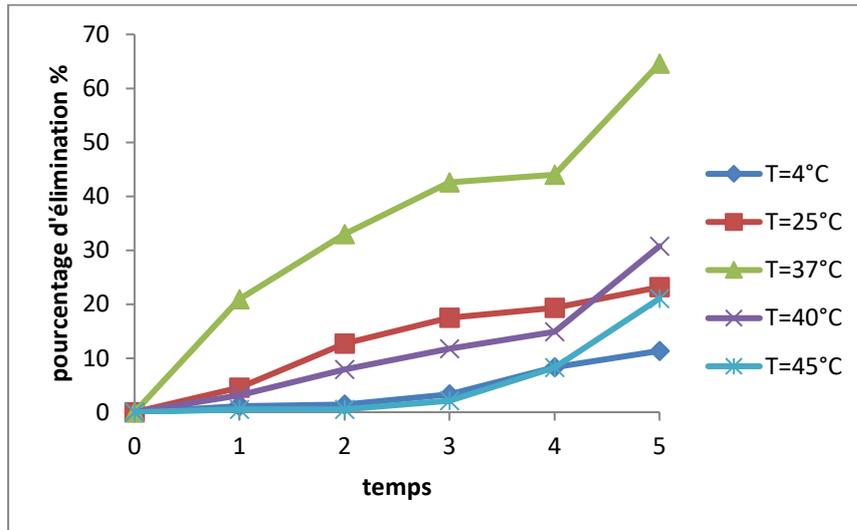


Figure 31: Pourcentage d'élimination du BM par BC1 en fonction du temps et de la température pour une concentration initiale de 10mg /l et un pH=7.

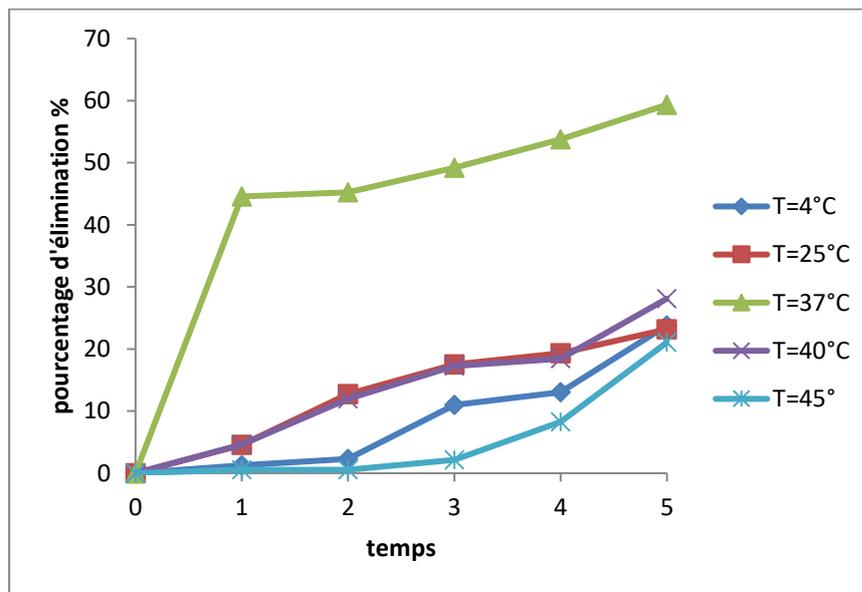


Figure 32 : Pourcentage d'élimination du BM par BP1 en fonction du temps et de la température pour une concentration initiale de 10mg /l et un pH=7.

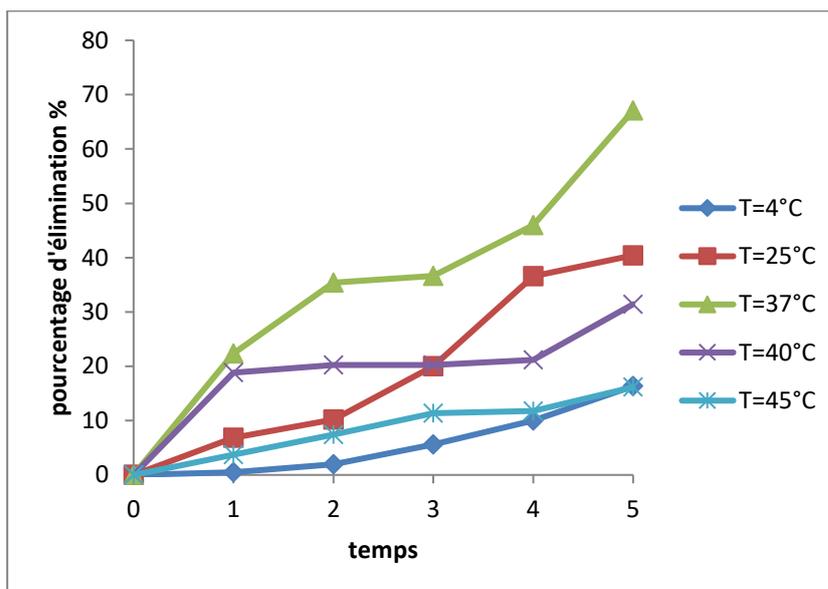


Figure 33: Pourcentage d'élimination du BM par BP2 en fonction du temps et de la température pour une concentration initiale de 10mg /l et un pH=7.

Les résultats présentés dans les figures 31, 32 et 33 montrent que le taux de dégradation est bien meilleur à une température d'incubation de 37°C pour les trois bactéries (pour une Cinit=10mg /l et un pH de 7), pour la bactérie BC1 on a obtenu un taux d'élimination de 65% pendant 5h d'incubation, de 59% pour la bactérie BP1 et de 67% pour la bactérie BP2 pendant 5h d'incubation, plus on s'éloigne de 37°C plus le taux d'élimination diminue, le même résultat est obtenue par P.Shah 2012, Bandary et al 2016 et Tripathi et al 2011 [138, 140, 141], par contre M. Kilany 2017 [84] a obtenu une meilleur dégradation à une température de 30°C. En cas des microorganismes la température est un facteur primordial pour l'activité microbienne, la cellule bactérienne dépend du changement de la température pour s'adapter au mécanisme biochimique et enzymatique [71].

On a observé que la dégradation du colorant est optimale à une température de 37°C où le métabolisme des cellules de nos bactéries est plus actif et capable de produire les enzymes nécessaires pour la dégradation du bleu de méthylène. A des hautes températures l'activité enzymatique est faible cela est dû peut être à la perte de viabilité cellulaire ou la dénaturation d'une enzyme azo- réductase. [71, 139]

II.3.3 Influence du pH sur la dégradation du bleu de Méthylène :

Les figures 34, 35 et 36 représentent la dégradation du bleu de méthylène par les bactéries *Pseudomonas chlororaphis* BC1 , *Acinetobacter Johnson II* BP1 et *Bacillus weihenstephanensis* BP2 en fonction du temps et du pH, ces résultats montrent que le taux de dégradation est plus élevé a un pH de 7 (34%) pour la bactérie BC1, (45%) pour la bactérie

BP1 et (32%) pour la bactérie BP2 pendant 6 H d'incubation et pour une concentration initiale de 10 mg/l, le même constat est obtenu par Bandary et al 2016 [140] contrairement à M. Kilany 2017 [84] qui a obtenu une meilleur élimination a un pH de 5.

Nos résultats sont similaires à celles trouvés par chen et al 2003, Guo et al 2007, saratale et al 2009 et 2010 [142-145], ou ils ont trouvé que le pH optimal pour la décoloration est souvent entre 6 et 10. Le taux de dégradation des colorants est plus élevé dans un pH optimal et a tendance à diminuer rapidement au pH fortement acide ou fortement alcalin. le milieu neutre facilite le transfert du colorant à travers la membrane cellulaire qui est considéré comme l'étape la plus importante dans la décoloration [71, 84, 139, 143, 146]

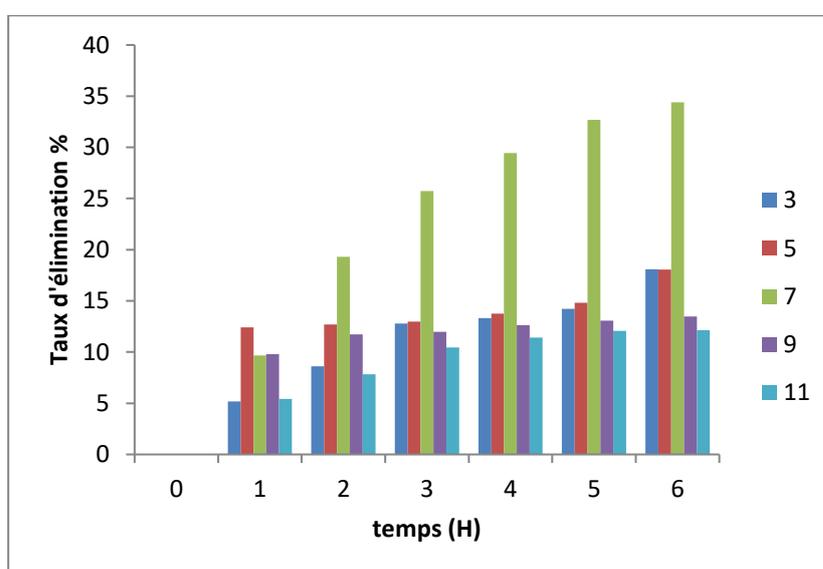


Figure 34: Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par BC1 pour une concentration initiale de 10mg /l et une température de 37° C.

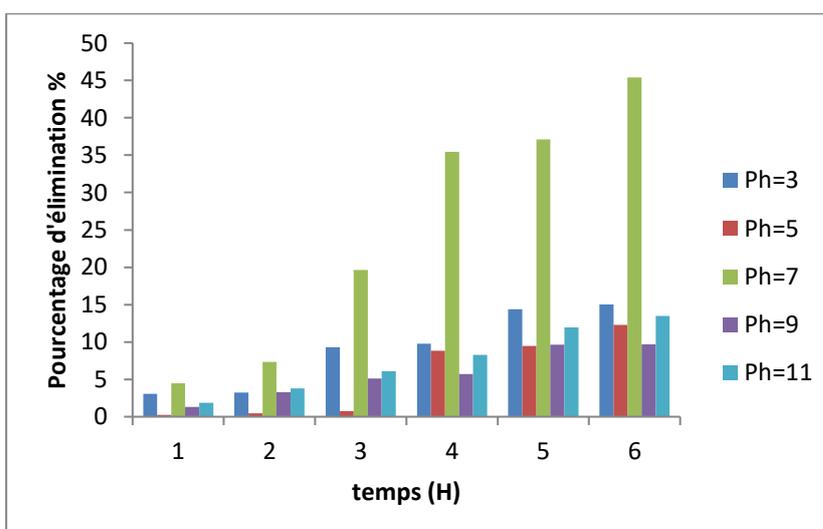


Figure 35 : Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par BP1 pour une concentration initiale de 10mg /l et une température de 37° C.

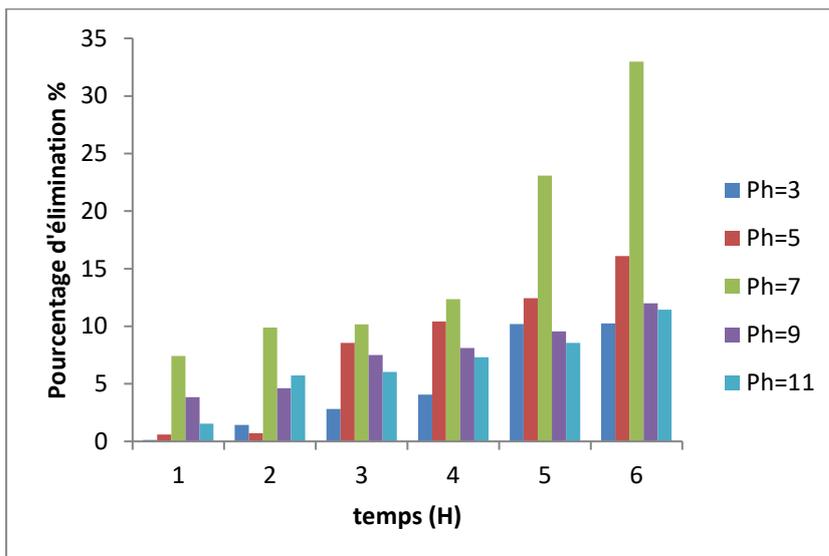


Figure 36 : Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par BP2 pour une concentration initiale de 10mg /l et une température de 37° C .

II.3.4 Influence de la source de carbone et de l'azote sur la dégradation du bleu de Méthylène :

A. Influence de la source de carbone :

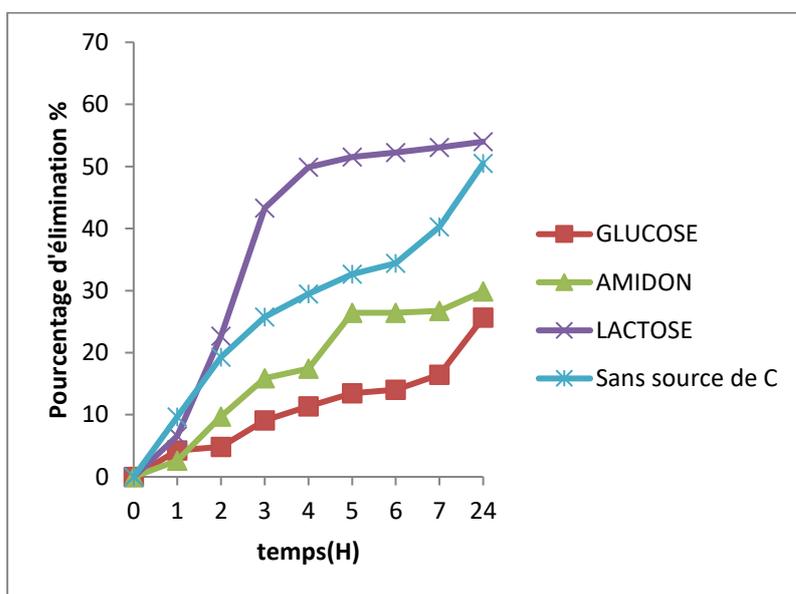


Figure 37: Influence de la source de carbone sur la dégradation du bleu de méthylène par le BC1 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

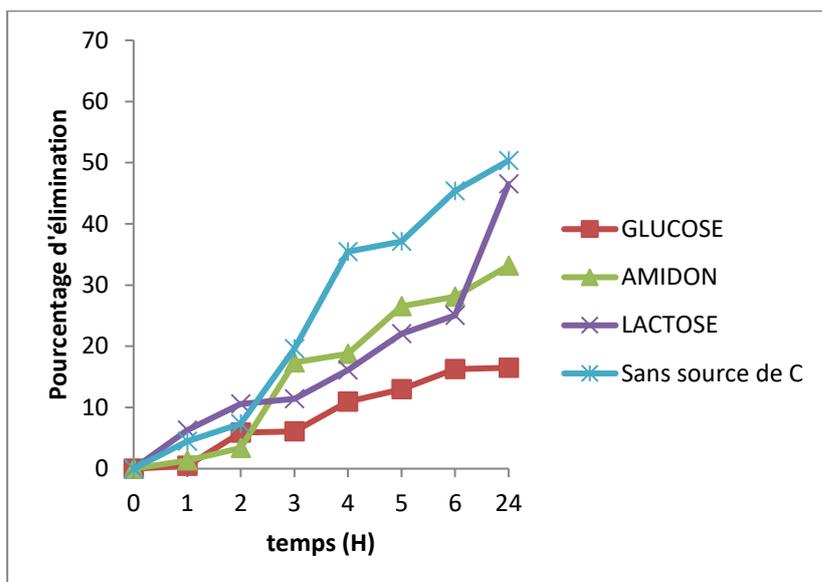


Figure 38 : Influence de la source de carbone sur la dégradation du bleu de méthylène par le BP1 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

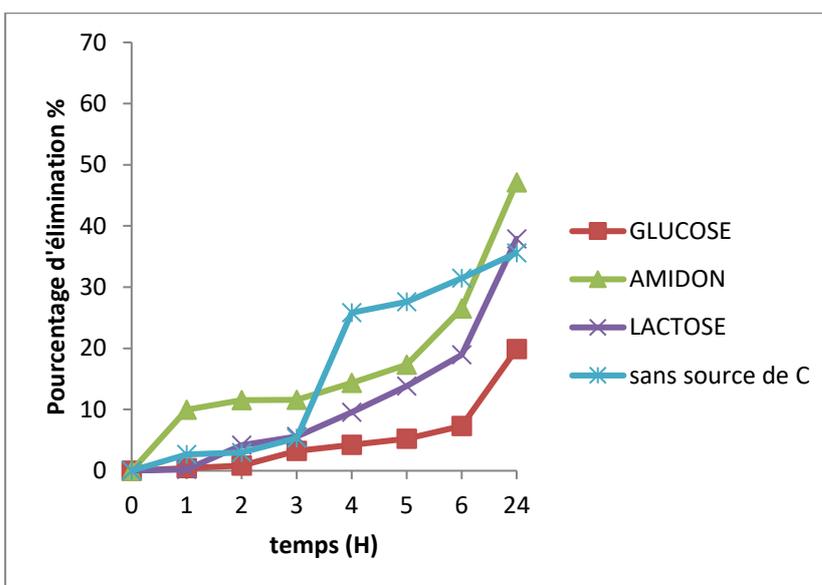


Figure 39 : Influence de la source de carbone sur la dégradation du bleu de méthylène par le BP2 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

Pour la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* BC1, l'ajout du lactose améliore la dégradation du bleu de méthylène (54% d'élimination avec le lactose, 26% avec le glucose, 30% avec l'amidon et 50% sans source de carbone pendant 24h d'incubation) et pour la bactérie *Bacillus weihenstephanensis* BP2 c'est l'ajout de l'amidon qui améliore nettement la dégradation (37% d'élimination avec le lactose, 17 % avec le glucose, 47% avec l'amidon et 30% sans source de carbone pendant 24h d'incubation) résultat similaire a été détecté par P.Shah [138] par contre l'ajout de source de carbone dans le milieu a un effet

négalif sur la dégradation du colorant par la bactérie *Acinetobacter Johnson II* BP1 (46% d'élimination avec le lactose, 16 % avec le glucose, 33% avec l'amidon et 50% sans source de carbone pendant 24h d'incubation), l'addition de sources de carbone semble moins efficace pour favoriser la décoloration probablement due à la préférence des cellules de la bactérie BP1 à assimiler les sources de carbone ajoutées sur l'utilisation des composés du colorant comme source de carbone [142].

B. Effet de la source d'azote :

L'ajout de source d'azote (Sulfate d'ammonium, chlorure d'ammonium et l'urée) a un effet négatif sur la dégradation du BM pour les trois bactéries (figures 40, 41 et 42) contrairement à Bandary et al 2016 [139] qui ont trouvé des meilleurs résultats avec l'ajout de source d'azote pour dégrader le bleu de méthylène par l'*E.coli*.

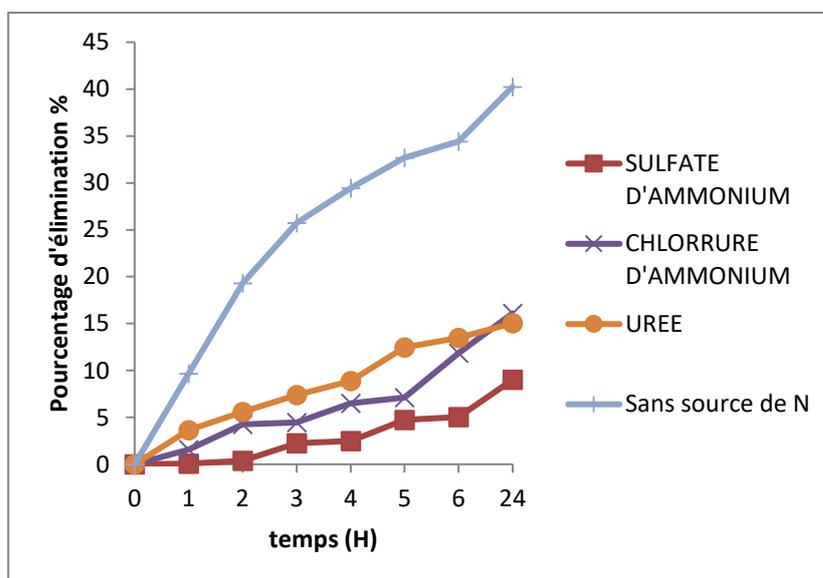


Figure 40 : Influence de la source d'azote sur le pourcentage d'élimination du bleu de Méthylène par BC1 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

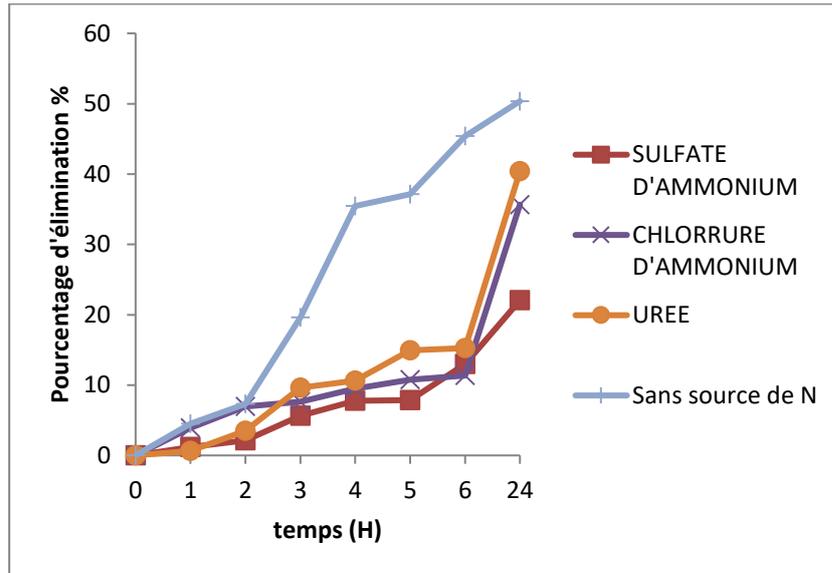


Figure 41 : Influence de la source d'azote sur le pourcentage d'élimination du bleu de Méthylène par BP1 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

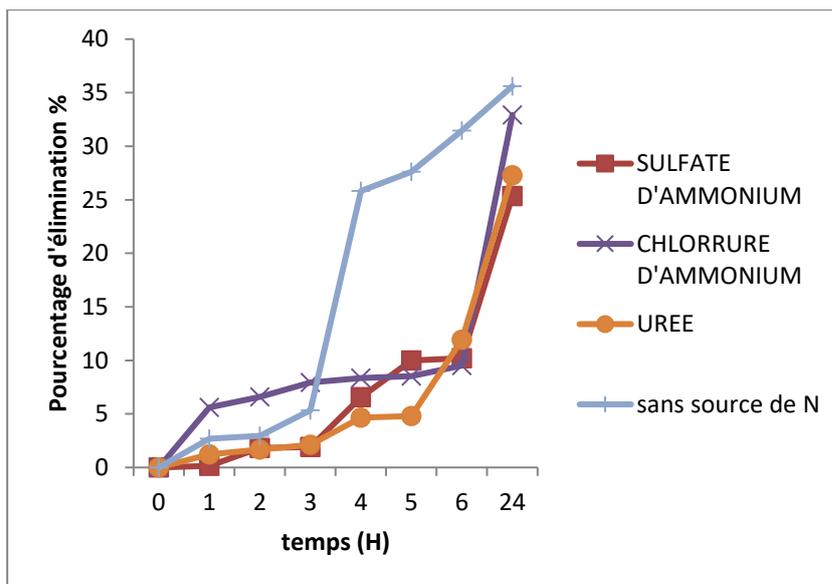


Figure 42 : Influence de la source d'azote sur le pourcentage d'élimination du bleu de Méthylène par BP2 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

II.4 Dégradation du vert de malachite :

II.4.1 Influence de la concentration initiale sur la dégradation du vert de malachite :

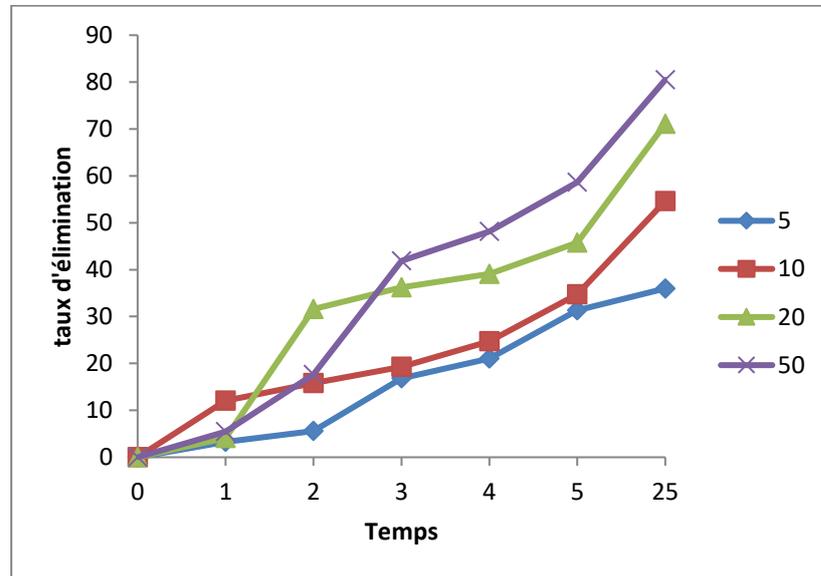


Figure 43: Influence de la concentration initiale sur la dégradation de VM par *Pseudomonas chlororaphis* BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

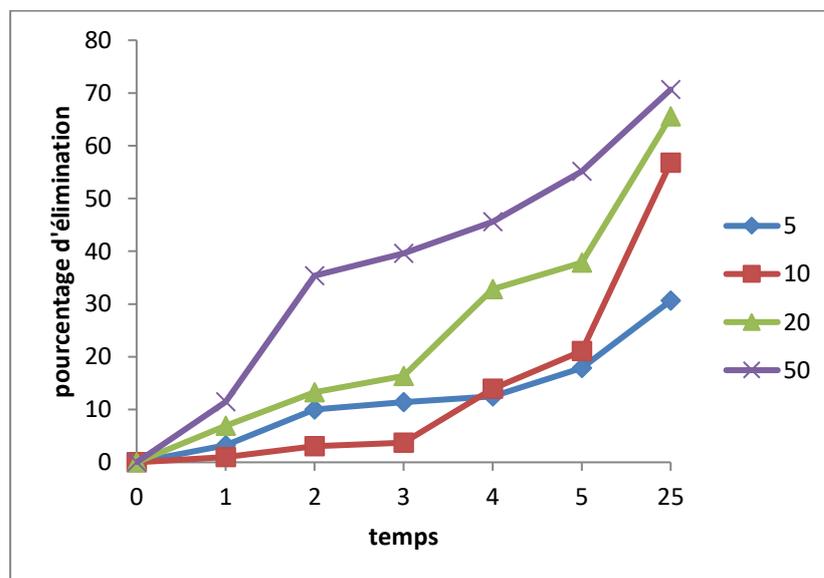


Figure 44 : Influence de la concentration initiale sur la dégradation de VM par *Acinetobacter Johnson II BP1* pour une température de 37° C et un pH=7 .

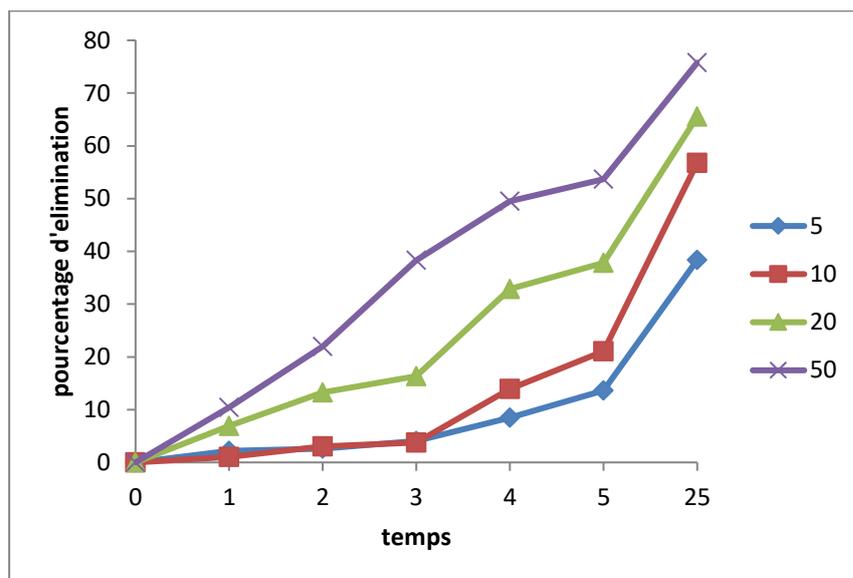


Figure 45 : Influence de la concentration initiale sur la dégradation de VM par *Bacillus weihenstephanensis* BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

D'après les figures 43, 44 et 45 on a constaté que les bactéries BC1, BP1 et BP2 ont une grande capacité à dégrader le vert de malachite , et que contrairement au bleu de méthylène la dégradation du Vert de Malachite augmente avec l'augmentation de la concentration initiale du colorant par les trois bactéries BC1, BP1 et BP2 (pour une $C_{int}=5$ mg/l on a un taux d'élimination de 35, 30 et 38% et pour $C_{int}= 50$ mg/l on a un taux d'élimination de 80, 70 et 76% par BC1, BP1 et BP2 respectivement) , ces résultats sont similaire à ceux trouvés par Wanyonyi et al 2017[128] , kilany 2017 [84] et Ayed et al 2008 [147] par contre ils sont différents à ceux trouvés par Habibi et Mehrabi 2017[148], Upendar et al 2017[88] pour la biodégradation du BM, Karatay et al 2015[149], Lavanya et al 2014[150], Shah et al 2013[151] et Saratale et al 2011[71] pour la biodégradation des colorants azoïques . Cela est dû probablement à la structure du vert de malachite qui est moins complexe et moins toxique que le bleu de méthylène et les colorants azoïques.

On a constaté aussi que la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* BC1 à donner un résultat plus important que *Acinetobacter Johnson II* BP1 et *Bacillus weihenstephanensis* BP2.

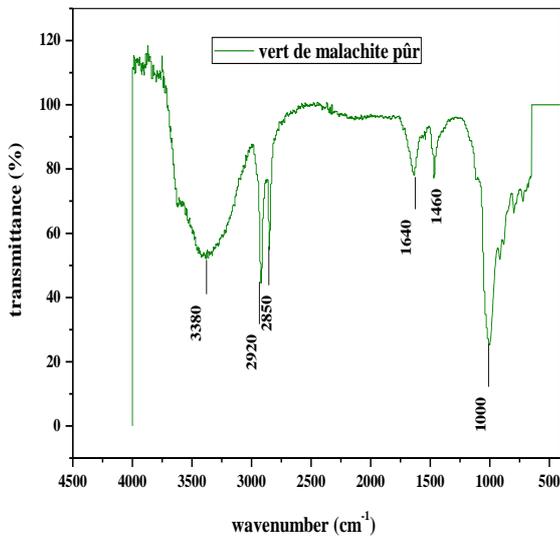


Figure 46 : Spectre FTIR du vert de malachite pur

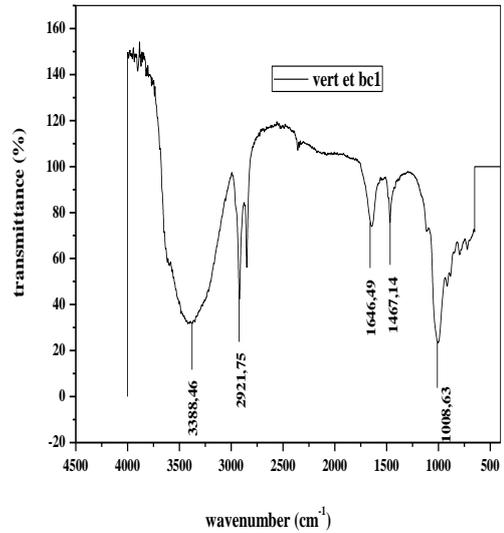


Figure 47 : Spectre FTIR du vert de malachite (Cinit=10mg/l) après dégradation par BC1.

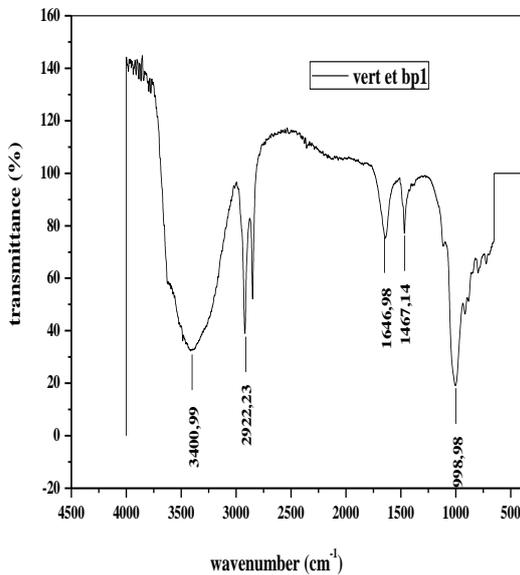


Figure 48: Spectre FTIR du vert de malachite (Cinit=10mg/l) après dégradation par BP1.

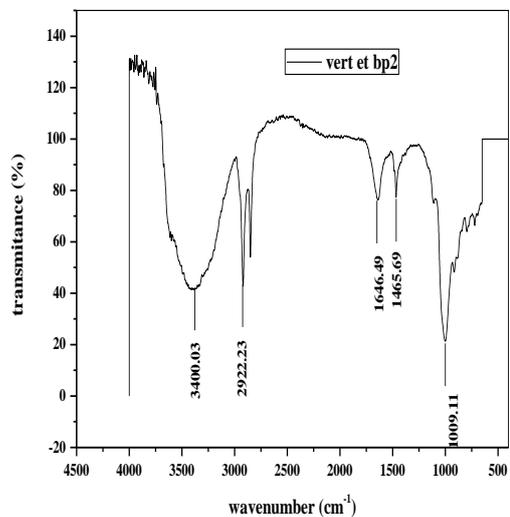


Figure 49: Spectre FTIR du vert de malachite (Cinit=10mg/l) après dégradation par BP2

Les spectres FTIR du vert de malachite pur ont montré les pics spécifiques dans la région des empreintes digitales (1500 à 500 cm⁻¹) pour les cycles benzéniques

monosubstitués et para-di substitués qui supportent le pic à 1640 cm^{-1} pour l'étirement C=C du noyau benzénique. De plus, le pic à 1000 cm^{-1} pour les vibrations d'étirement C-N et le pic à 2920 cm^{-1} pour l'étirement C-H du groupe -CH₃ asymétrique, un groupe -NH₂ libre a montré une vibration d'étirement antisymétrique d'amide à 3380 cm^{-1} .

Des variations remarquables dans la région des empreintes digitales (1500 à 500 cm^{-1}) de la spectroscopie FTIR du vert de malachite pur (Figure 46) et celles du VM après dégradation par BC1(figure 47), par BP1 (figure 48) et par BP2 (figure 49) , où on a des changements sur tous les pics, ce qui indiquent une biodégradation du VM par ces bactéries en s'attaquant à toutes les fonctions du colorants.

II.4.2 Influence de la température sur la dégradation du vert de malachite :

Les figures 50,51 et 52 présentent l'influence de la température d'incubation sur la dégradation du colorant.

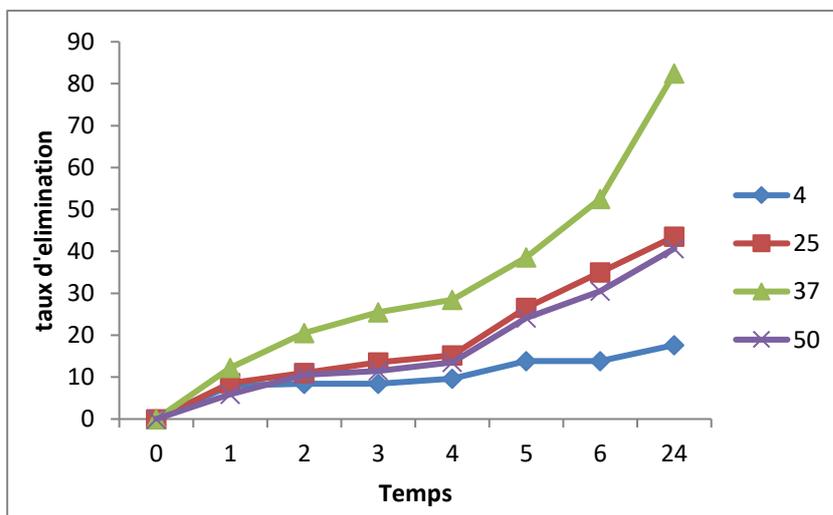


Figure 50: Influence de la température sur la dégradation de VM par BC1 pour une concentration initiale de 10mg/l et un $\text{pH}=7$.

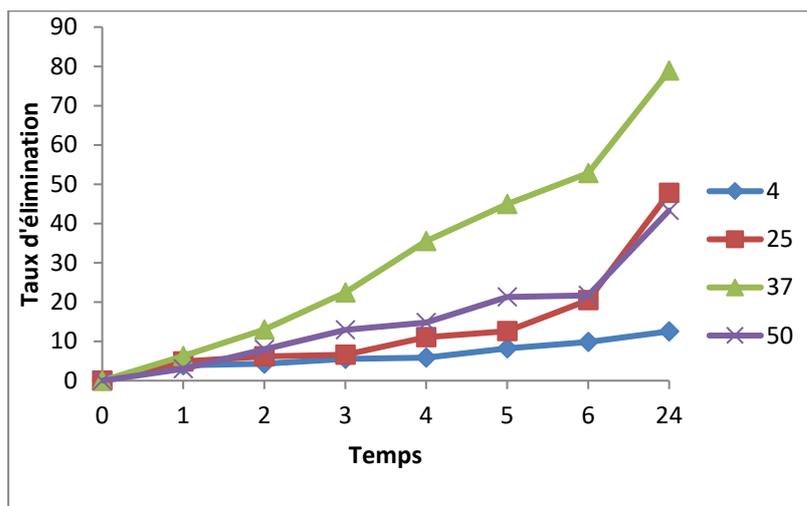


Figure 51 : Influence de la température sur la dégradation de VM par BP1 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

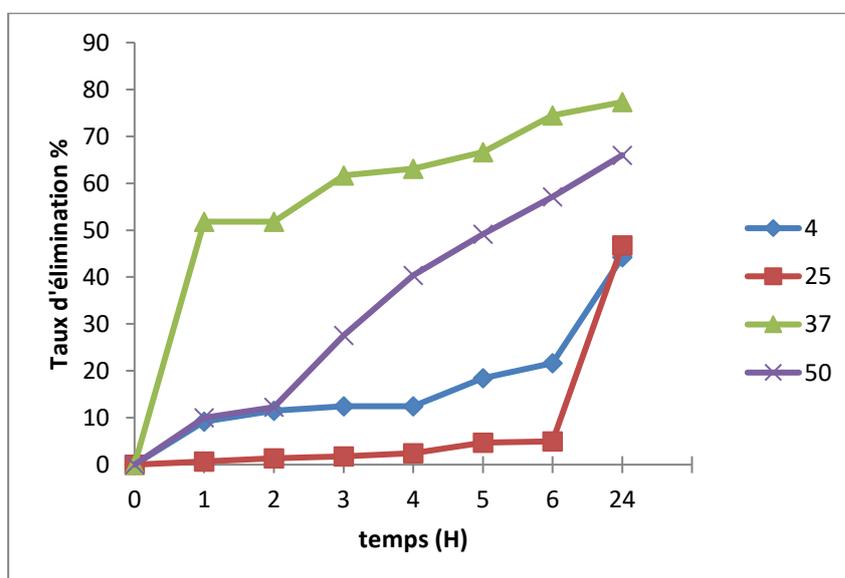


Figure 52 : Influence de la température sur la dégradation de VM par BP2 pour une concentration initiale de 10mg /l et un pH=7.

Les résultats montrent que la dégradation augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à 37 ° C, à des températures plus élevées la décoloration diminue. Cela est dû à la dénaturation thermique de l'enzyme des molécules bactériennes [128].

On a constaté que la bactérie Bp2 dégrade le vert de malachites dans des températures élevées 66% d'élimination a une température d'incubation de 50°C, même à une température faible 4°C on a une dégradation plus au moins faible 44% d'élimination ,on peut dire que la bactérie *Bacillus weihenstephanensis* BP2 s'adapte à toutes les conditions de température mieux que les bactéries *Pseudomonas chlororaphis* BC1 et *Acinetobacter Johnson II* BP1 .

II.4.3 Influence de la source de carbone et d'azote sur la dégradation du vert de malachite :

A. Influence de la source de carbone :

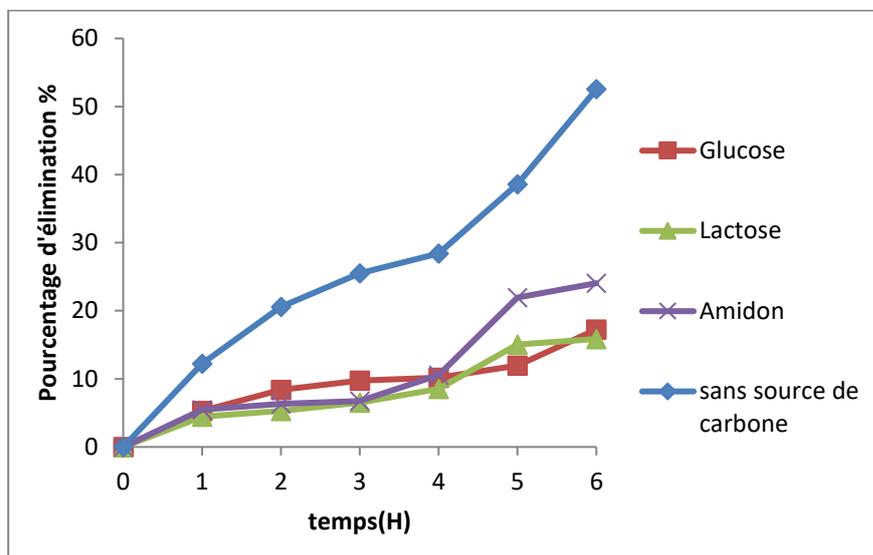


Figure 53 : Influence de la source de carbone sur le pourcentage d'élimination du vert de malachite par la bactérie BC1 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

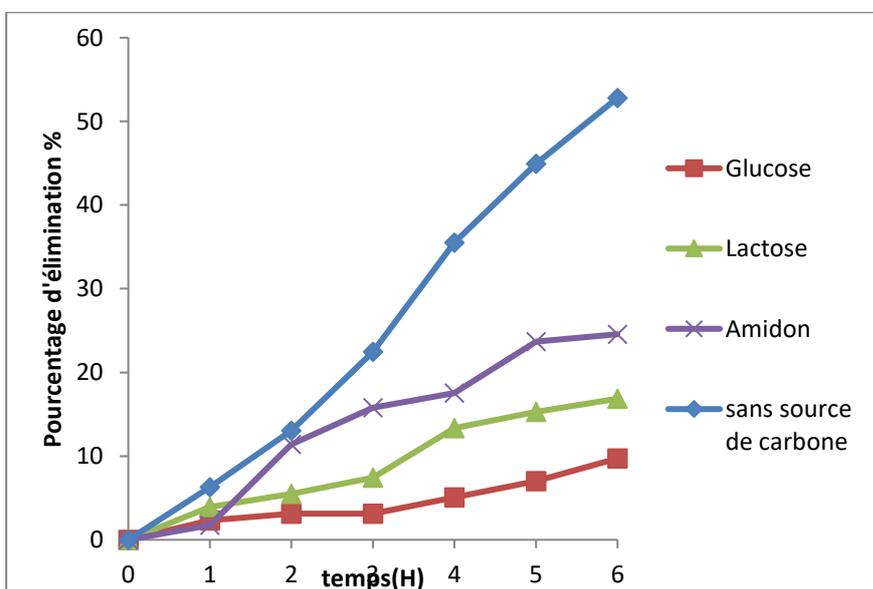


Figure 54 : Influence de la source de carbone sur le pourcentage d'élimination du vert de malachite par la bactérie BP1 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

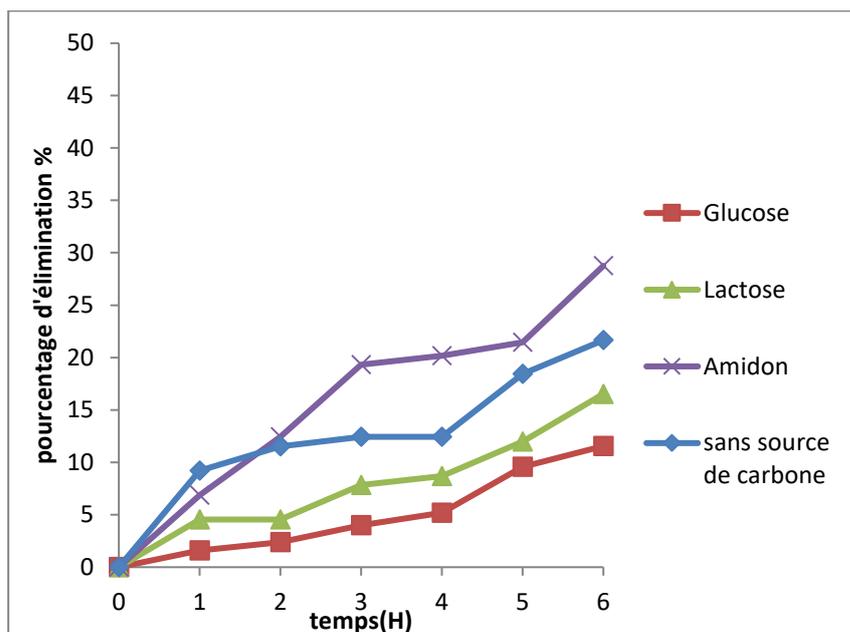


Figure 55: Influence de la source de carbone sur le pourcentage d'élimination du vert de malachite par la bactérie BP2 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

D'après les figures 53, 54 et 55 on a constaté que l'ajout de source de carbone n'améliore pas la dégradation sauf pour la bactérie BP2, en ajoutant l'amidon on a eu une légère amélioration (un taux d'élimination de 28% par contre sans l'ajout de source de carbone est de 21% après 6h d'incubation), le même résultat est trouvé par V. Pushpa et K. Yogendra [152] ou ils ont signalés des résultats similaires concernant la dégradation du rouge 2G.

B. Influence de source d'azote :

Les figures 56,57et 58 représentent l'influence de l'ajout de source d'azote dans le milieu sur le taux d'élimination du vert de malachite par BC1,BP1et par BP2 respectivement en fonction du temps pour une température d'incubation de 37°C et un pH de 7 et une concentration initiale de 20mg/l.

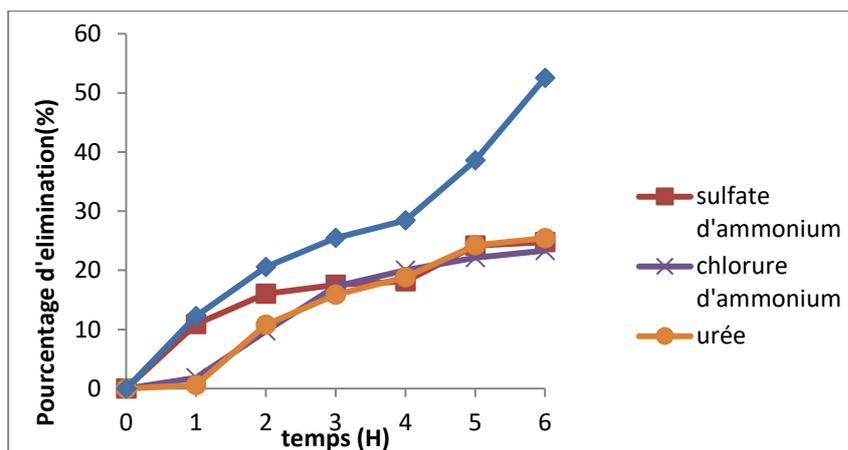


Figure 56: Influence de source d'azote sur l'élimination du vert de malachite par BC1 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 ..

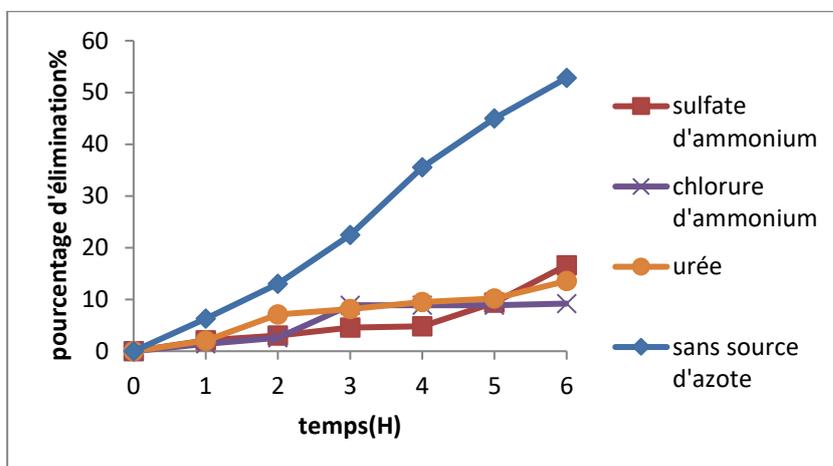


Figure 57: Influence de source d'azote sur l'élimination du vert de malachite par BP1 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

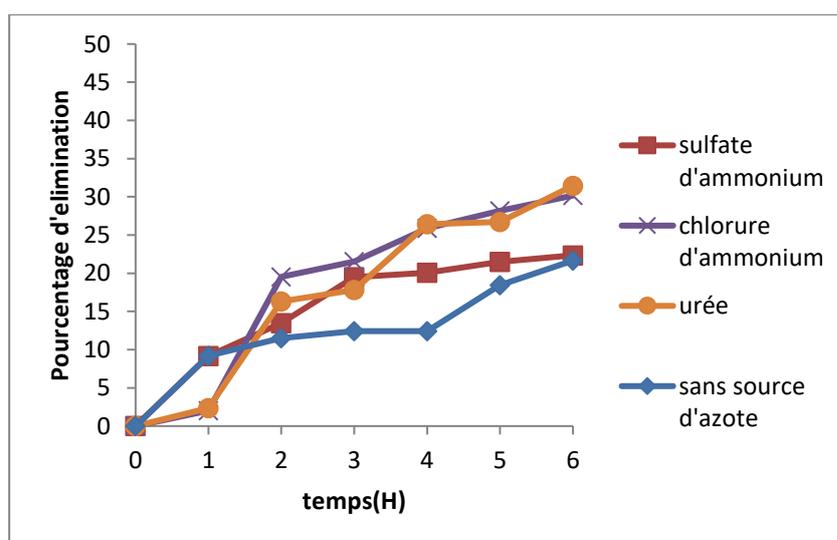


Figure 58: Influence de source d'azote sur l'élimination du vert de malachite par BP2 pour une concentration initiale de 10mg /l , une température de 37° C et un pH=7 .

L'ajout de la source d'azote influe négativement sur la dégradation du VM par BC1 et par BP1 (52% d'élimination sans source d'azote et un taux de 24, 23 et 25% par l'ajout du sulfate d'ammonium, chlorure d'ammonium et de l'urée respectivement pour la bactérie BC1, un taux de 53% sans ajout d'azote, 16, 9 et 13% de dégradation en ajoutant le sulfate d'ammonium, le chlorure d'ammonium et l'urée respectivement pour la bactérie BP1 le même constat qu'on a trouvé avec la dégradation du bleu de méthylène par contre la bactérie BP2, la dégradation est meilleure avec la présence de source d'azote (22% d'élimination sans source d'azote et un taux de 22,30 et 31% avec l'ajout du sulfate d'ammonium, chlorure d'ammonium et de l'urée respectivement), la bactérie BP2 a besoin d'une source d'azote pour dégrader le vert de malachite à l'inverse de BC1 et BP1 qui ont tendance à mieux dégrader le colorants sans additifs.

II.5 L'étude cinétique de dégradation des colorants par les différentes bactéries :

II.5.1 Détermination de l'ordre des réactions de dégradation des colorants :

Les résultats obtenus à différentes concentrations initiales des colorants BM et VM ont été utilisés pour déterminer l'ordre de décoloration du colorant.

II.5.1.1 La dégradation du bleu de Méthylène :

1. Dégradation de BM par la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* BC1 :

➤ Modèle cinétique d'ordre zéro :

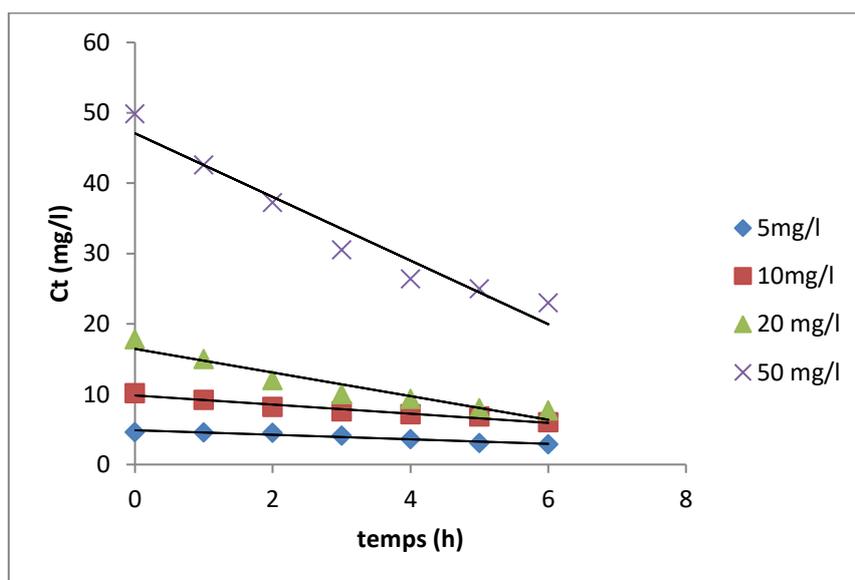


Figure 59 : Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

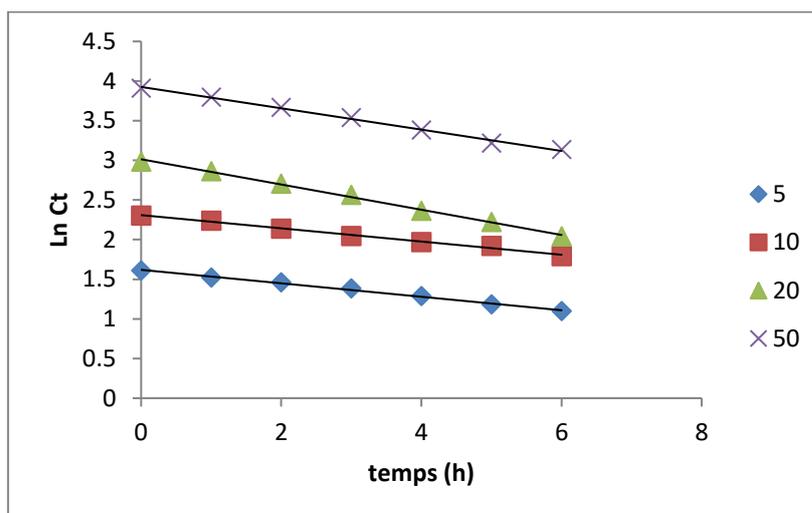
➤ **Modèle cinétique du premier ordre:**

Figure 60 : Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BC1 une température de 37° C et un pH=7.

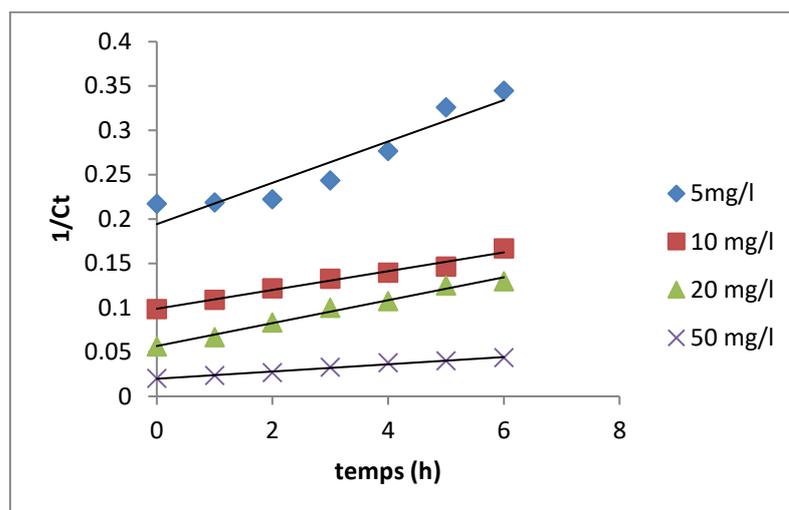
➤ **Modèle cinétique du second ordre:**

Figure 61 : Cinétique du second ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

2. Dégradation de BM par la bactérie *Acinetobacter Johnson II* BP1 :
- Modèle cinétique d'ordre zéro :

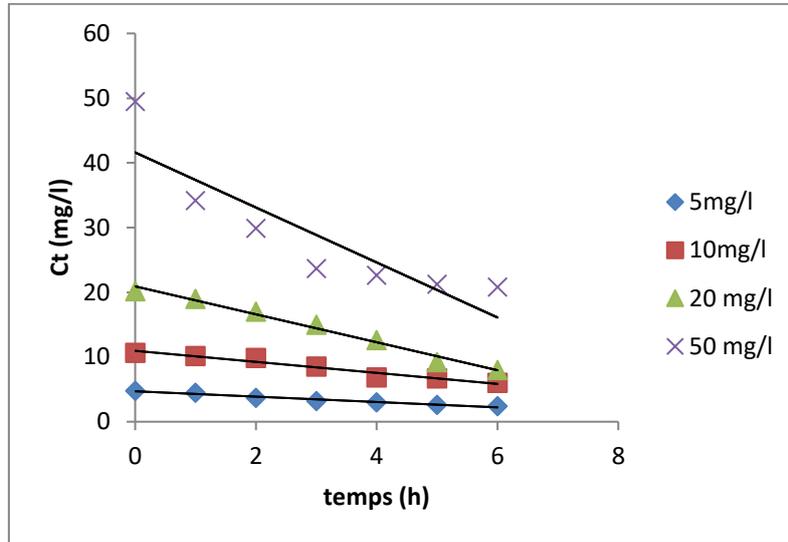


Figure 62 : Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

- Modèle cinétique du premier ordre:

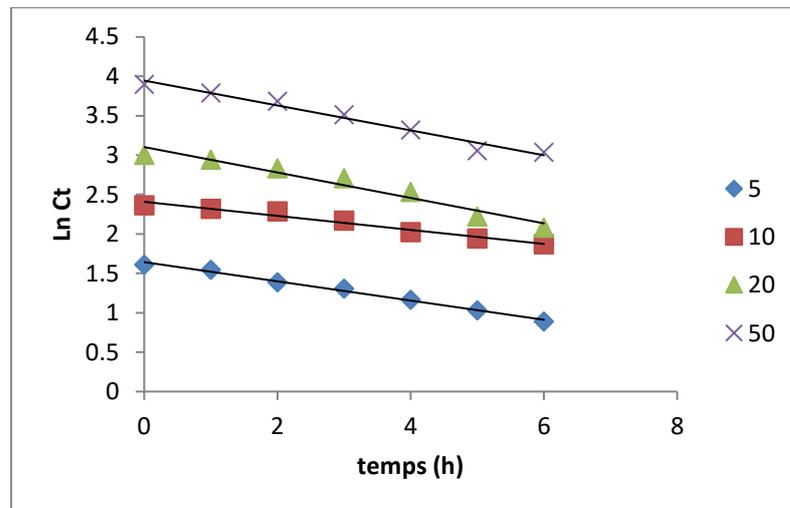


Figure 63 : Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7.

- **Modèle cinétique du deuxième ordre:**

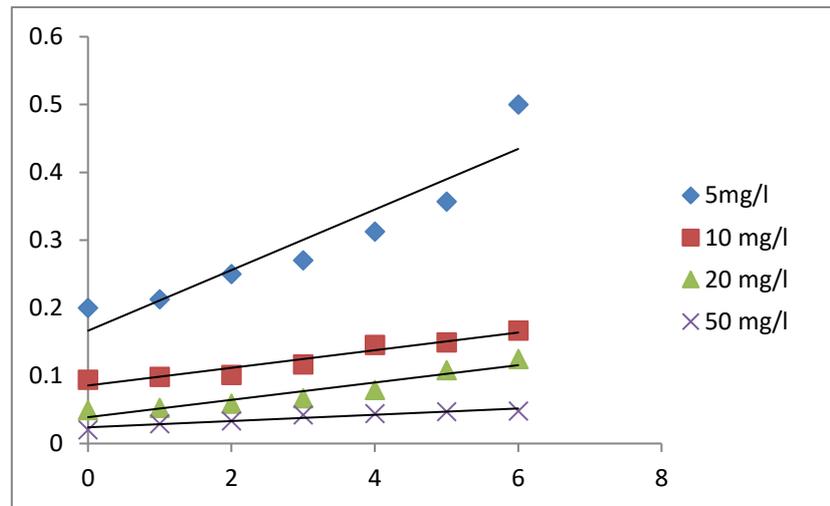


Figure 64 : Cinétique du deuxième ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

3. Dégradation de BM par la bactérie *Bacillus weihenstephanensis* BP2 :

- **Modèle cinétique d'ordre 0 :**

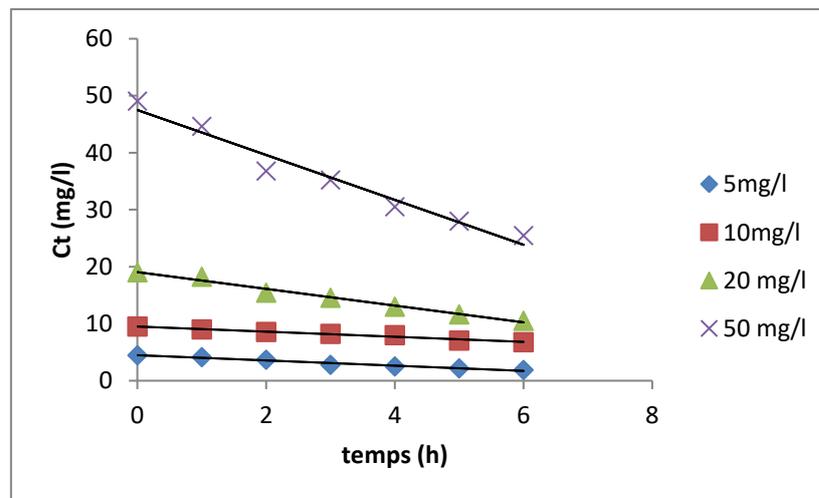


Figure 65 : Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7.

• **Modèle cinétique du premier ordre:**

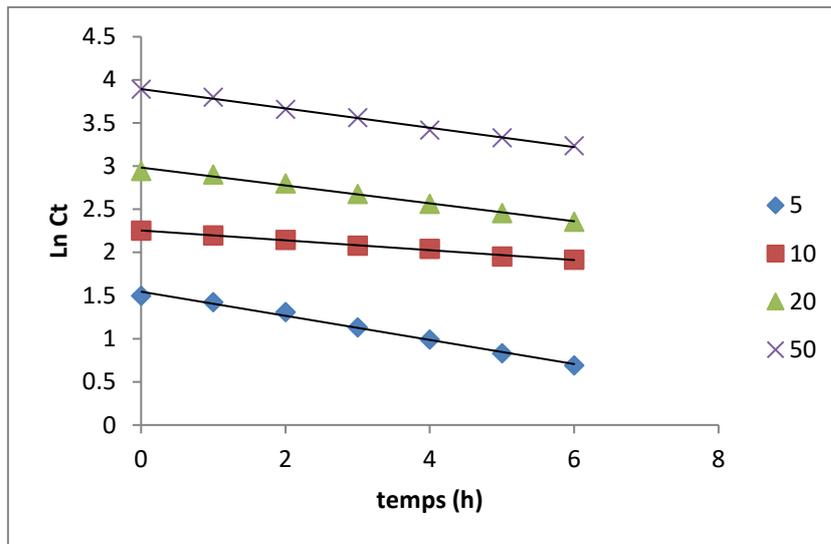


Figure 66 : Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

• **Modèle cinétique du deuxième ordre:**

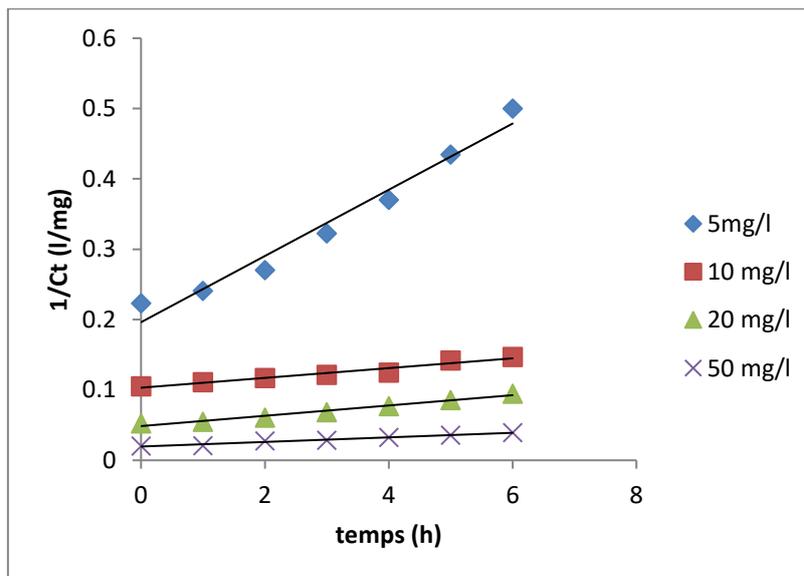


Figure 67 : Cinétique du deuxième ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

Tableau 15 : Constantes cinétiques de zéro, premier et second ordre et coefficients de corrélation obtenus dans la dégradation enzymatique du colorant BM par les bactéries BC1, BP1 et BP2 :

Bactéries	Modèle cinétique	Constantes	5 mg/l	10 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> BC1	ordre zéro	k_0 (mg/l min)	4,2397	0,65	1,6781	4,5213
		C_0 (mg/l)	46,659	9,8226	16,435	47,08
		R^2	0,9127	0,9667	0,9185	0,9447
	Premier ordre	k_1 (mg/l min)	0,085	0,0834	0,1592	0,1345
		C_0 (mg/l)	4,4006	6,277	8,1921	10,6709
		R^2	0,9939	0,9917	0,9966	0,9954
	Deuxième ordre	k_2 (mg/l min)	0,0233	0,0106	0,0129	0,0041
		C_0 (mg/l)	5,1493	10,1214	17,6366	50,5050
		R^2	0,8966	0,981	0,9866	0,8966
<i>Acinetobacter Johnson II</i> BP1	ordre zéro	k_0 (mg/l min)	0,4142	0,8522	2,1602	4,2493
		C_0 (mg/l)	4,7021	10,954	20,914	41,6
		R^2	0,9592	0,9538	0,9852	0,7877
	Premier ordre	k_1 (mg/l min)	0,122	0,089	0,1614	0,158
		C_0 (mg/l)	5,16704005	11,10394	22,251293	51,733214
		R^2	0,9918	0,9684	0,9545	0,9746
	Deuxième ordre	k_2 (mg/l min)	0,0447	0,013	0,0128	0,0046
		C_0 (mg/l)	6,0132291	11,682243	25,7731959	41,8410042
		R^2	0,8681	0,939	0,903	0,9219
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> BP2	ordre zéro	k_0 (mg/l min)	0,4591	0,4482	1,4676	3,942
		C_0 (mg/l)	4,48	9,5077	19,049	47,496
		R^2	0,9708	0,9725	0,9837	0,9646
	Premier ordre	k_1 (mg/l min)	0,1398	0,0571	0,1037	0,1122
		C_0 (mg/l)	4,688903	9,532432	19,75685	49,08235
		R^2	0,9915	0,9937	0,9907	0,9958
	Deuxième ordre	k_2 (mg/l min)	0,0471	0,007	0,0073	0,0033
		C_0 (mg/l)	5,094245	9,689925	20,57612	51,02048
		R^2	0,9683	0,9491	0,978	0,9741

Les constantes de vitesse de la réaction de dégradation et les coefficients d'analyse de la méthode des moindres carrés sont présentés dans le tableau 14, Les coefficients de corrélation (R^2) étaient les plus élevés dans le modèle de premier ordre dans la gamme de

0,991 à 0.996 pour la bactérie BC1, de 0.968 à 0.991 pour la bactérie BP1 et dans la gamme de 0.990 à 0.995 pour la bactérie BP2 , par rapport aux modèles cinétiques d'ordre zéro et de second ordre qui étaient dans des gammes inférieures. Les résultats montrent que la biodégradation enzymatique du colorant BM par les trois bactéries suit un modèle cinétique de premier ordre, ces résultats sont cohérent avec les résultats antérieurs rapportés dans la littérature [128, 153].

II.5.1.2 La dégradation du vert de malachite :

1. Dégradation de VM par la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* BC1 :

➤ Modèle cinétique d'ordre zéro :

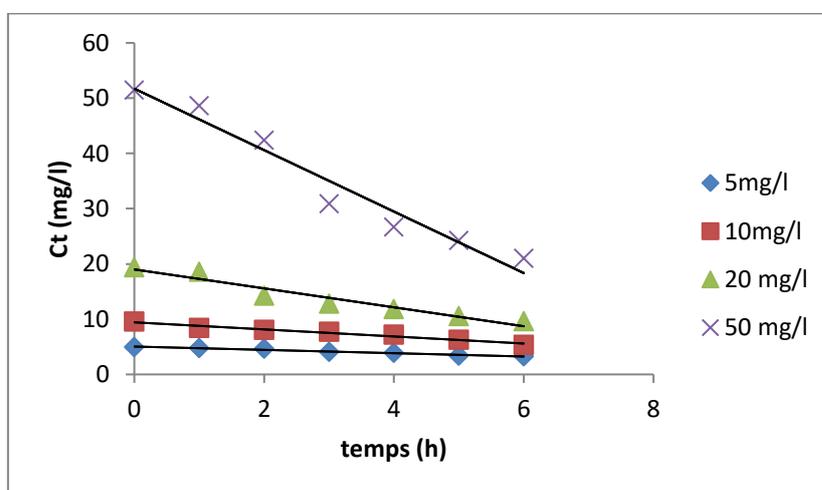


Figure 68: Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Modèle cinétique du premier ordre:

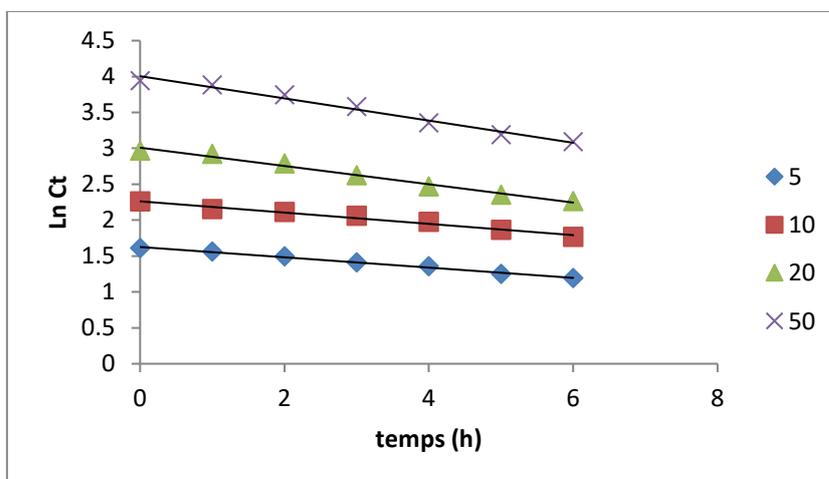


Figure 69: Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ **Modèle cinétique du second ordre:**

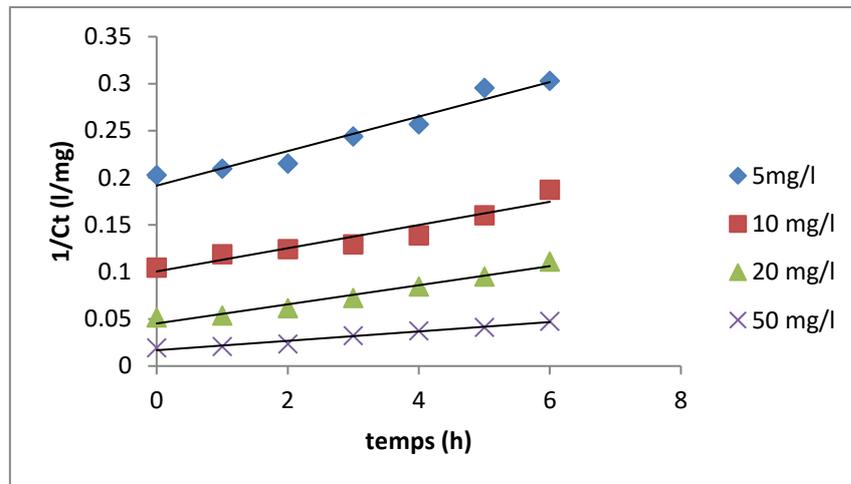


Figure 70 : Cinétique du second ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7.

2. Dégradation de VM par la bactérie *Acinetobacter Johnson II* BP1 :

• **Modèle cinétique d'ordre zéro :**

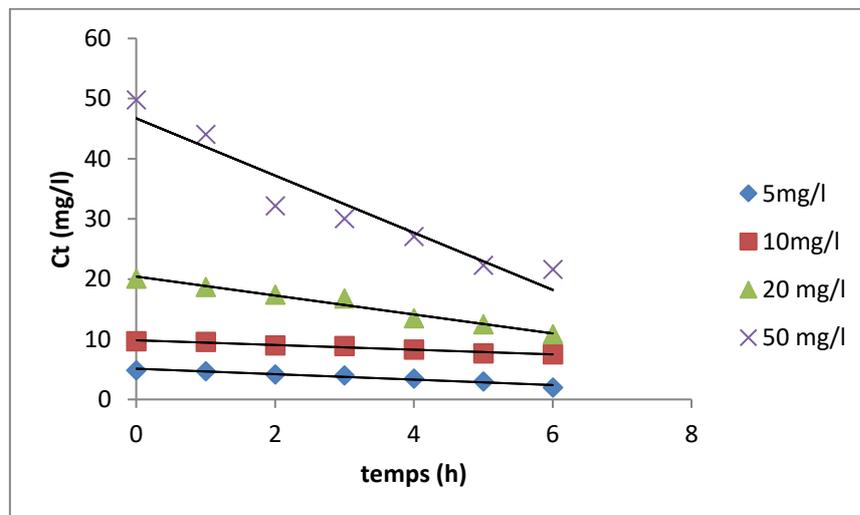


Figure 71 : Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

- **Modèle cinétique du premier ordre:**

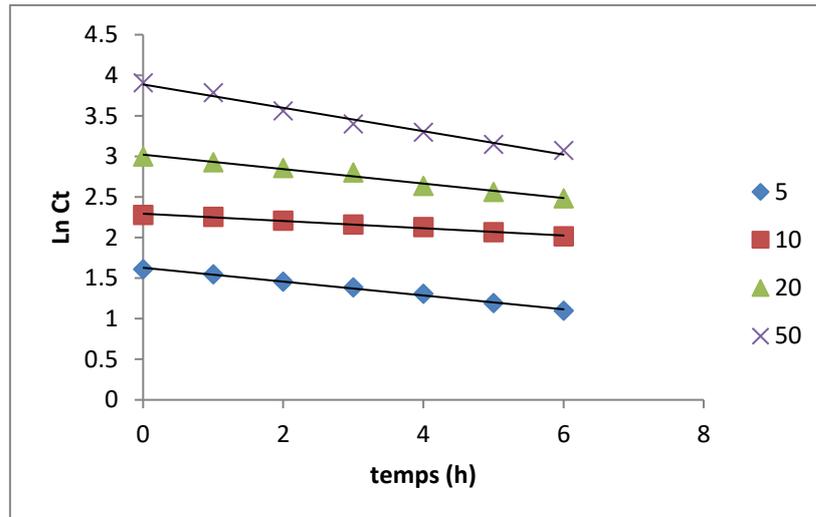


Figure 72 : Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

- **Modèle cinétique du deuxième ordre:**

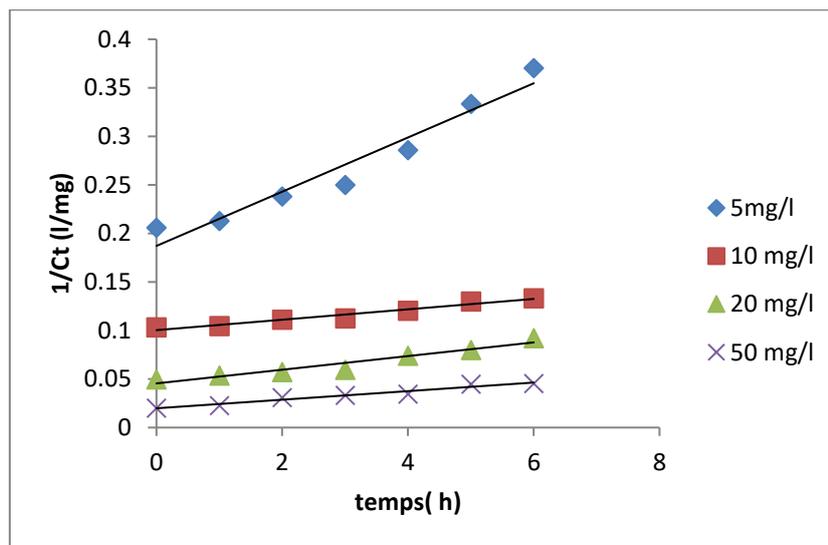


Figure 73 : Cinétique du deuxième ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du BM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

3. Dégradation de VM par la bactérie *Bacillus weihenstephanensis* BP2 :

- **Modèle cinétique d'ordre 0 :**

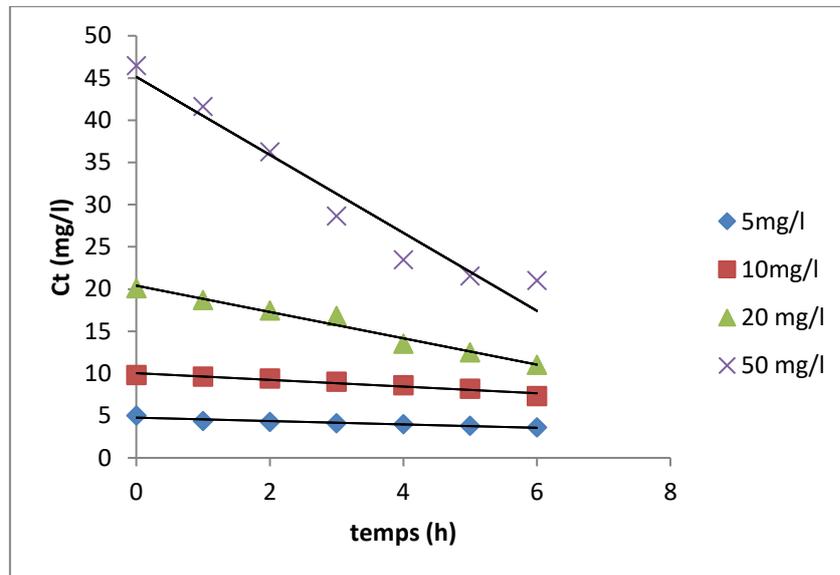


Figure 74: Cinétique d'ordre zéro de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

- **Modèle cinétique du premier ordre:**

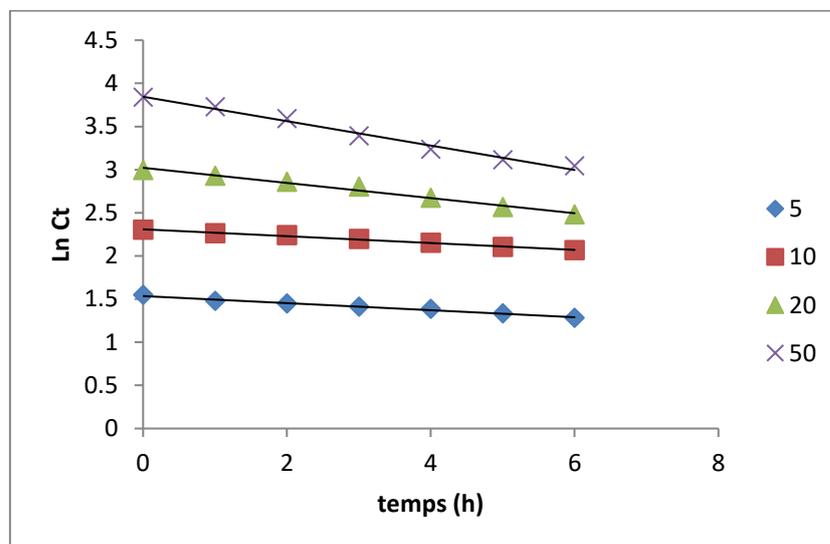


Figure 75: Cinétique du premier ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

- **Modèle cinétique du deuxième ordre:**

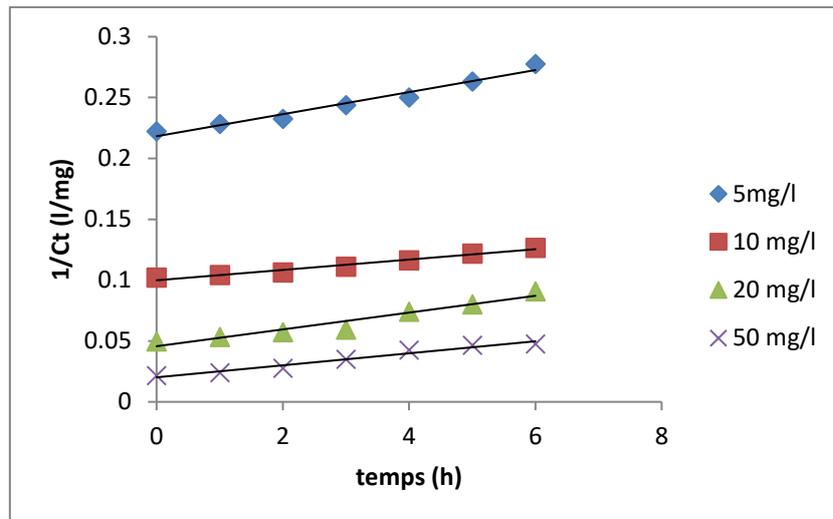


Figure 76 : Cinétique du deuxième ordre de dégradation de différentes concentrations initiales du VM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

Tableau 16 : Constantes cinétiques de zéro, premier et second ordre et coefficients de corrélation obtenus dans la dégradation enzymatique du colorant VM par les bactéries BC1, BP1 et BP2 :

Bactéries	Modèle cinétique	Constantes	5 mg/l	10 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> BC1	ordre zéro	k_0 (mg/l min)	0,3002	0,6389	1,7133	5,5621
		Co (mg/l)	5,0464	9,4279	19	51,725
		R^2	0,9657	0,9673	0,936	0,9542
	Premier ordre	k_1 (mg/l min)	0,0717	0,0785	0,1274	0,1546
		Co (mg/l)	5,08299167	9,6032348	20,2671227	54,8663375
		R^2	0,9918	0,9812	0,986	0,9819
	Deuxième ordre	k_2 (mg/l min)	0,0183	0,0123	0,0102	0,005
		Co (mg/l)	5,21648409	9,95024876	22,1238938	59,5238095
		R^2	0,9472	0,9131	0,9675	0,9713
<i>Acinetobacter Johnson II</i> BP1	ordre zéro	k_0 (mg/l min)	0,4523	0,3914	1,576	4,7516
		Co (mg/l)	5,1078	9,8374	20,429	46,718
		R^2	0,9429	0,9692	0,9747	0,9167
	Premier ordre	k_1 (mg/l min)	0,0854	0,0447	0,0891	0,144
		Co (mg/l)	5,09316783	9,91352513	20,5302621	48,7546218
		R^2	0,9932	0,989	0,9824	0,9839
	Deuxième ordre	k_2 (mg/l min)	0,0279	0,0054	0,007	0,0044
		Co (mg/l)	5,34473544	9,96015936	21,978022	50,2512563
		R^2	0,9445	0,9557	0,9359	0,9542
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> BP2	ordre zéro	k_0 (mg/l min)	0,2004	0,3964	1,5599	4,6195
		Co (mg/l)	4,7625	10,032	20,402	45,136
		R^2	0,9105	0,9408	0,9745	0,9472
	Premier ordre	k_1 (mg/l min)	0,0409	0,0397	0,0878	0,1415
		Co (mg/l)	4,63993334	10,0583185	20,5199996	46,7586844
		R^2	0,9831	0,9926	0,9844	0,9875
	Deuxième ordre	k_2 (mg/l min)	0,0091	0,0043	0,0069	0,0049
		Co (mg/l)	4,58295142	10,01001	21,8818381	49,5049505
		R^2	0,9661	0,9741	0,9402	0,9663

D'après le tableau n°16 on a constaté que les résultats obtenus pour le vert de malachite sont identique à celle trouvé pour le bleu de méthylène, d'où la dégradation enzymatique du colorant VM par les trois bactéries suit un modèle cinétique du premier ordre.

II.5.2 Détermination de la vitesse maximale de dégradation des colorants BM et VM (V_{max}) et de la constante de vitesse de décoloration (K_m) :

II.5.2.1 La dégradation du bleu de Méthylène :

1. Dégradation de BM par la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* BC1 :

➤ Représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN

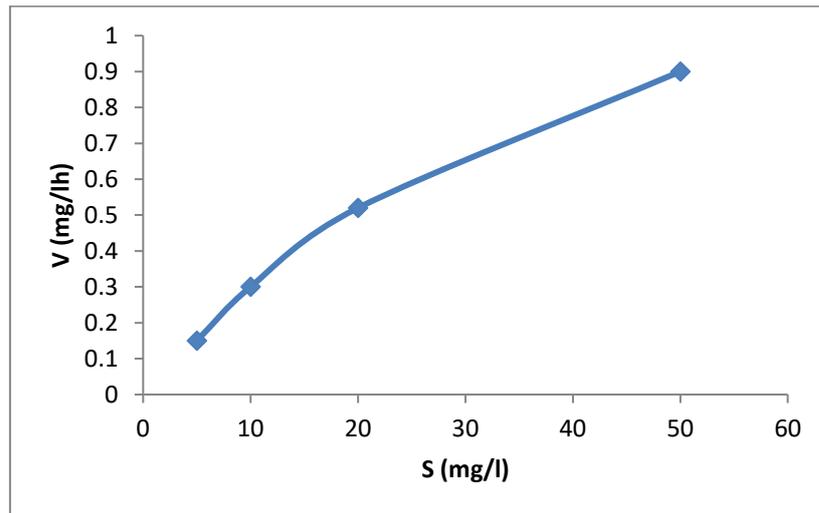


Figure 77 : Représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de BM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Représentation graphique de Lineweaver-Burk :

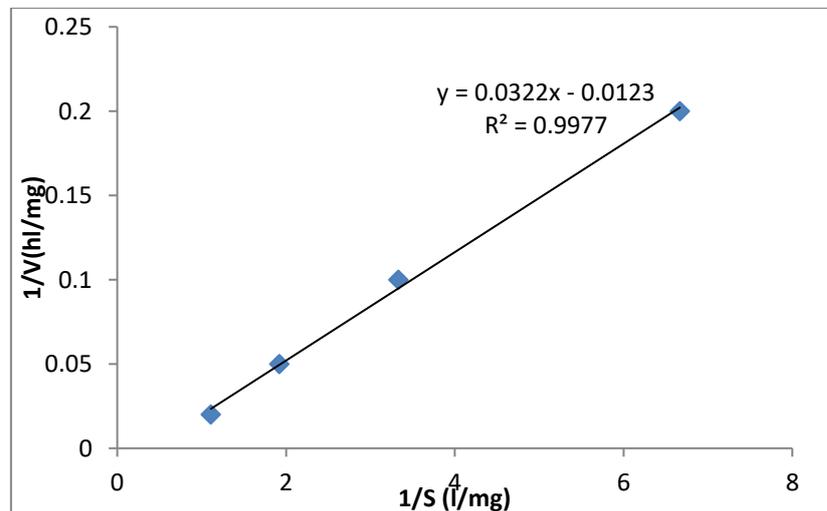


Figure 78 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de BM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

Les données expérimentales correspondaient assez bien à l'équation de Lineweaver-Burk avec une valeur R^2 élevée de 0,9977.

➤ Représentation graphique d'Eadie-Hofstee :

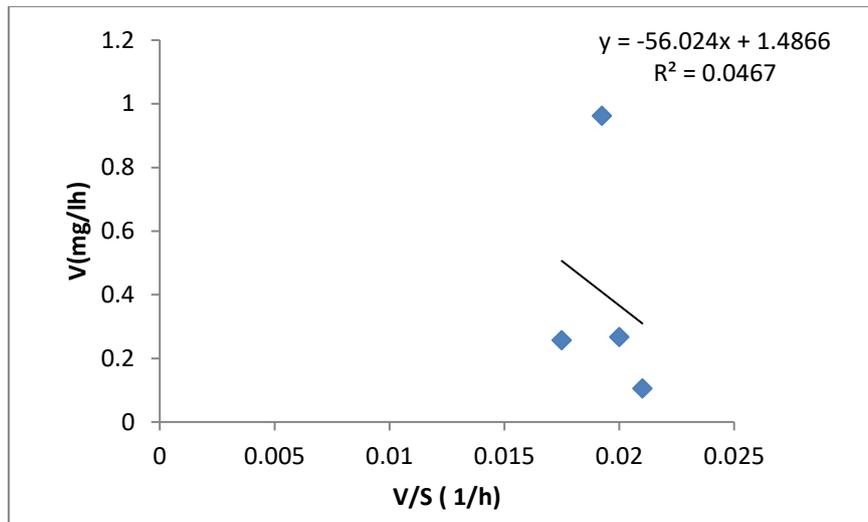


Figure 79 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de BM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

D'après la figure79 et le coefficient de corrélation $R^2 = 0.0467$, on a constaté que la représentation graphique d'Eadie-Hofstee n'est pas approprié pour décrire la biodégradation du BM par BC1 le même résultat est trouvé par Wanyonyi et al (2017) [128].

2. Dégradation de BM par la bactérie *Acinetobacter Johnson II* BP1 :

➤ représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN

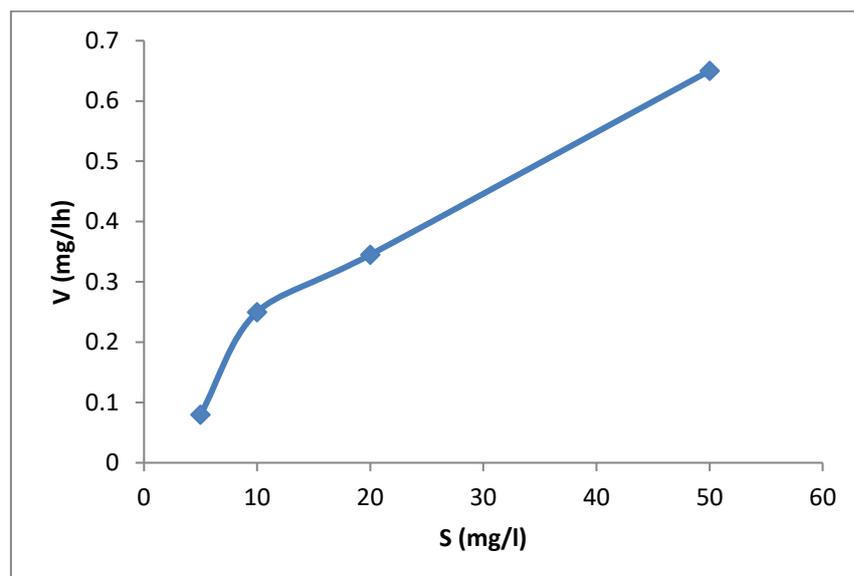


Figure 80 : Représentation graphique de MICHAELIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de BM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Représentation graphique de Lineweaver-Burk :

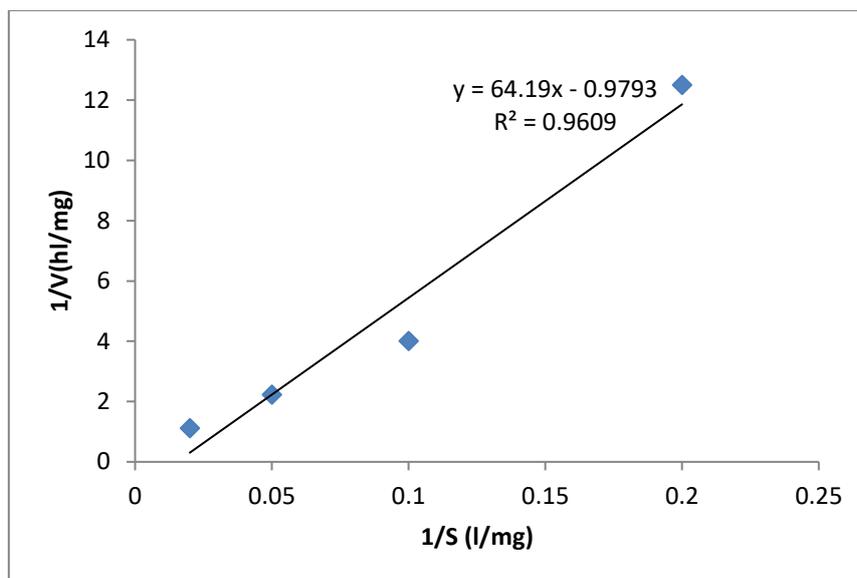


Figure 81 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de BM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Représentation graphique d' Eadie-Hofstee :

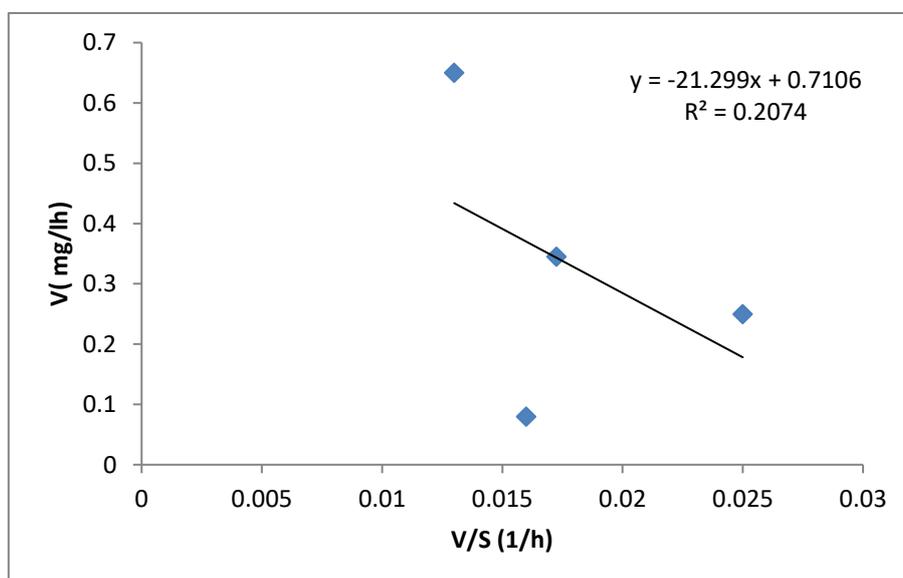


Figure 82 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de BM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

3. Dégradation de BM par la bactérie *Bacillus weihenstephanensis* BP2 :
- représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN

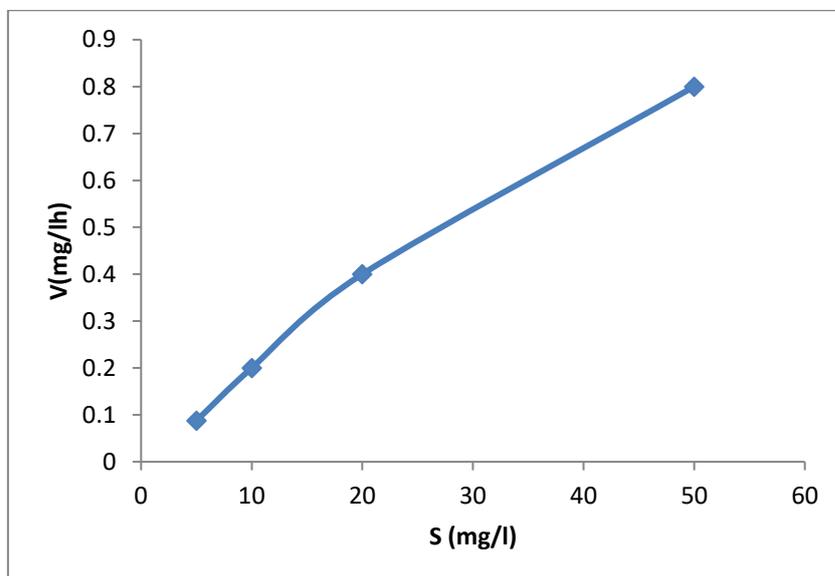


Figure 83 : Représentation graphique de MICHAELIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de BM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

- Représentation graphique de Lineweaver-Burk :

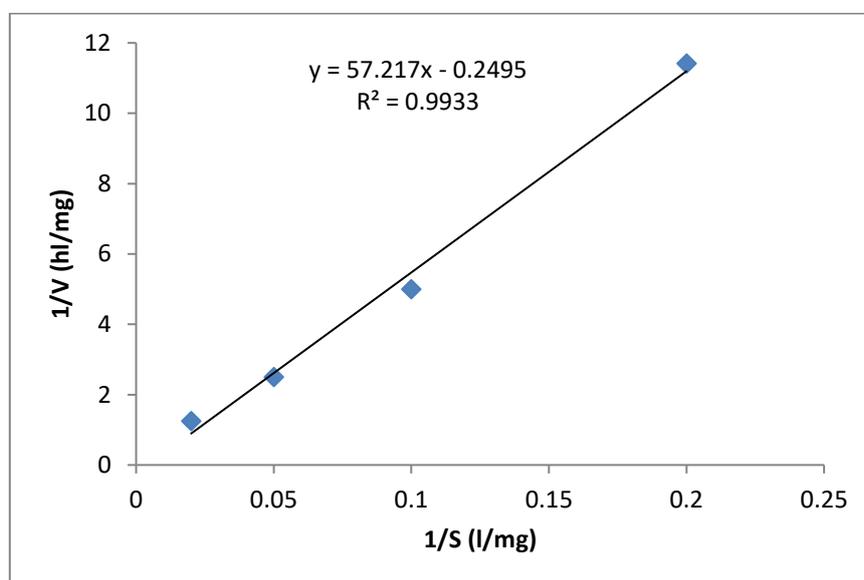


Figure 84 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de BM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Représentation graphique d' Eadie-Hofstee :

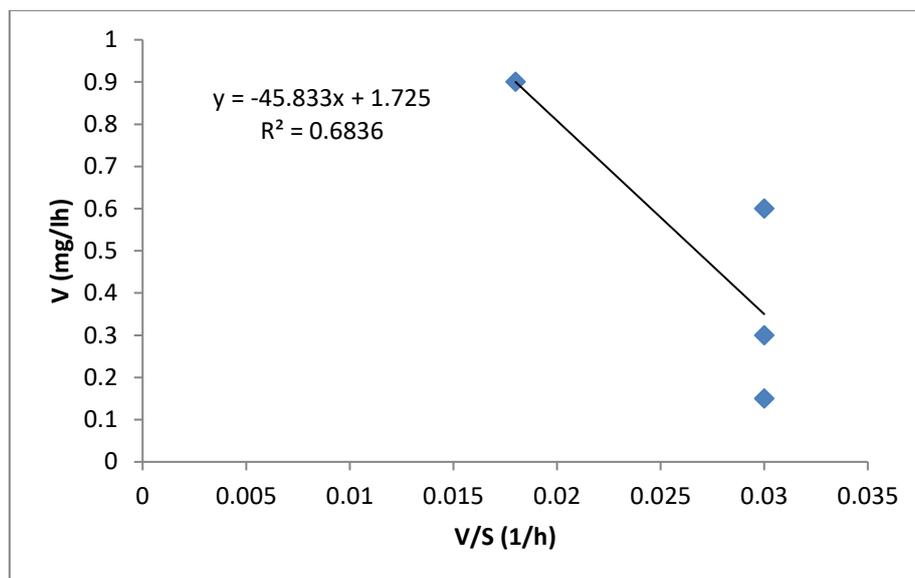


Figure 85 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de BM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

D'après les figures 82, 83, 84 et 85 on a confirmé que la représentation graphique de Lineweaver-Burk est la plus approprié pour déterminer V_{max} et K_m ($R^2= 0,9609$ Pour la bactérie BP1 et $R^2= 0,9933$ pour la bactérie BP2).

Tableau 17 : Comparaison des valeurs de K_m et V_{max} pour la décoloration enzymatique du colorant BM par les différentes bactéries :

Bactéries	K_m (mg/l)	V_{max} (mg/lh)	R^2
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> BC1	2,61788618	81,300813	0,9977
<i>Acinetobacter Johnson II</i> BP1	65,5468192	1,02113755	0,9609
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> BP2	229,326653	4,00801603	0,9933

II.5.2.2 La dégradation du vert de malachite :

1. Dégradation de VM par la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* BC1 :

➤ Représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN

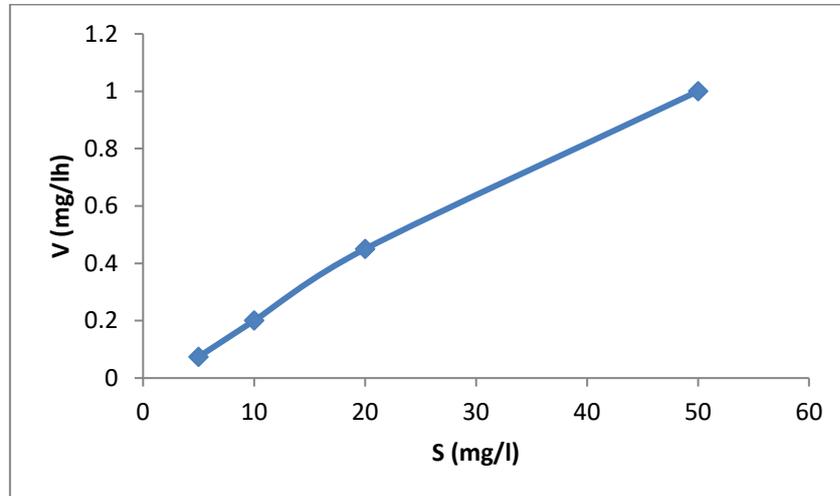


Figure 86 : Représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de BM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Représentation graphique de Lineweaver-Burk :

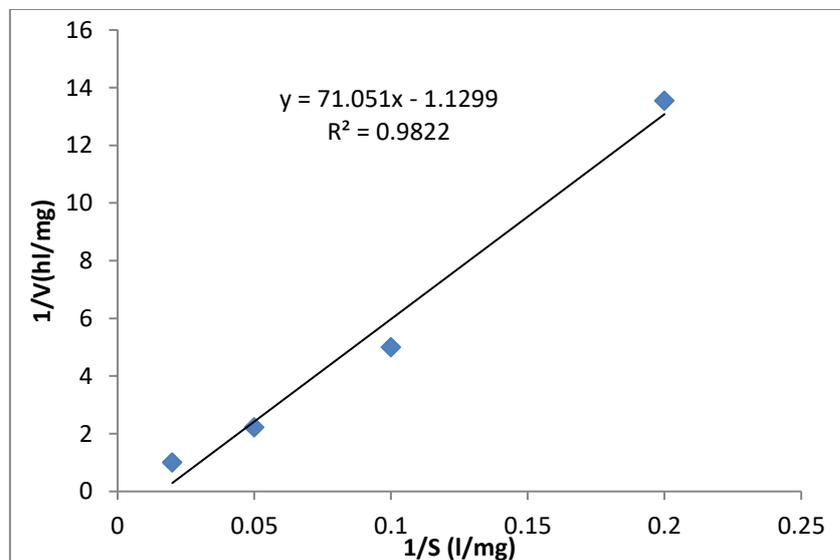


Figure 87: Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de VM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Représentation graphique d' Eadie-Hofstee :

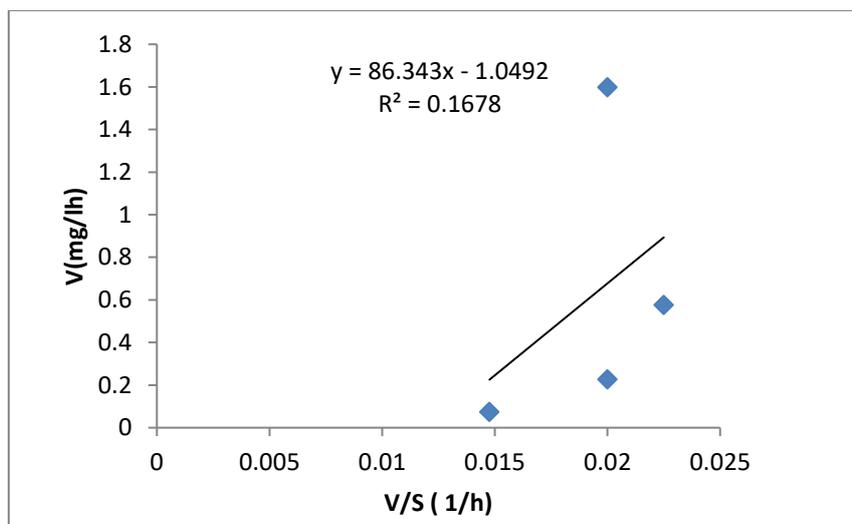


Figure 88 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de VM par BC1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

2. Dégradation de VM par la bactérie *Acinetobacter Johnson II* BP1 :

➤ représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN

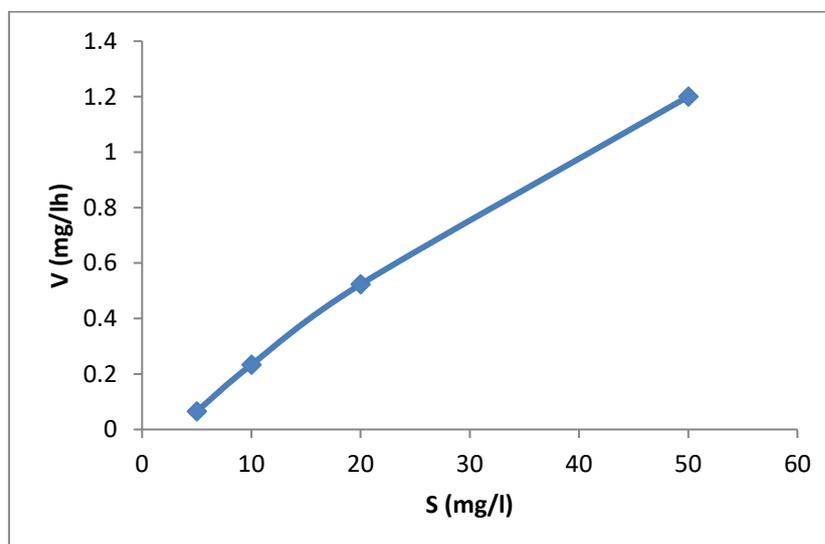


Figure 89: Représentation graphique de MICHAELIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de VM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Représentation graphique de Lineweaver-Burk :

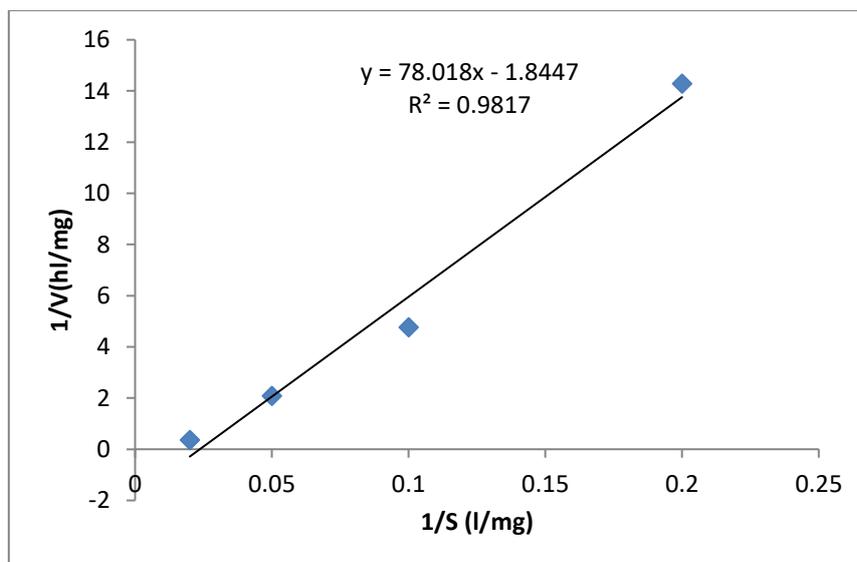


Figure 90 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de VM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Représentation graphique d' Eadie-Hofstee :

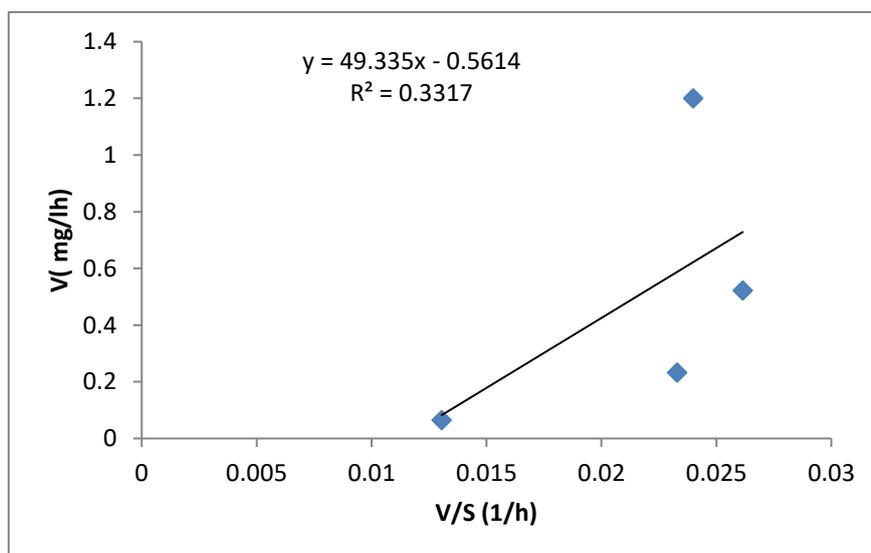


Figure 91 : Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de VM par BP1 pour une température de 37° C et un pH=7 .

3. Dégradation de VM par la bactérie *Bacillus weihenstephanensis* BP2 :

- représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN

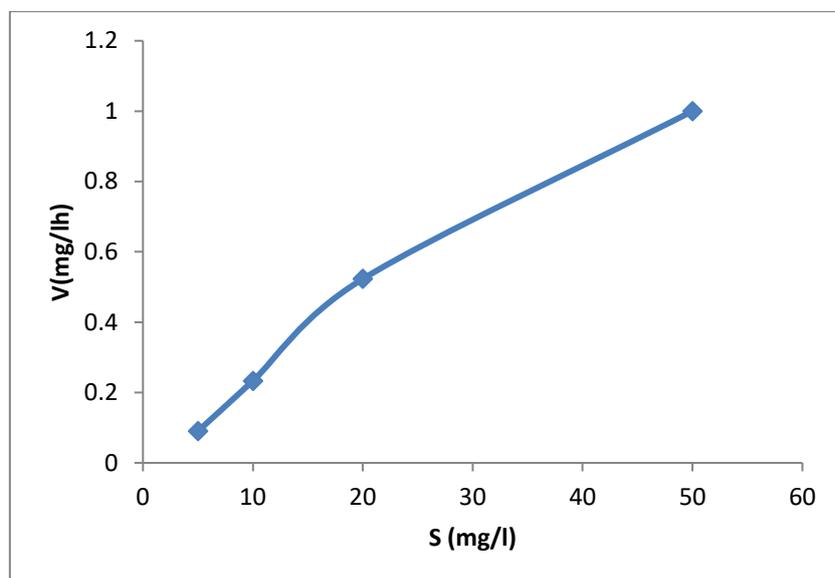


Figure 92: Représentation graphique de MICHAELIS-MENTEN de la décoloration enzymatique de VM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

- Représentation graphique de Lineweaver-Burk :

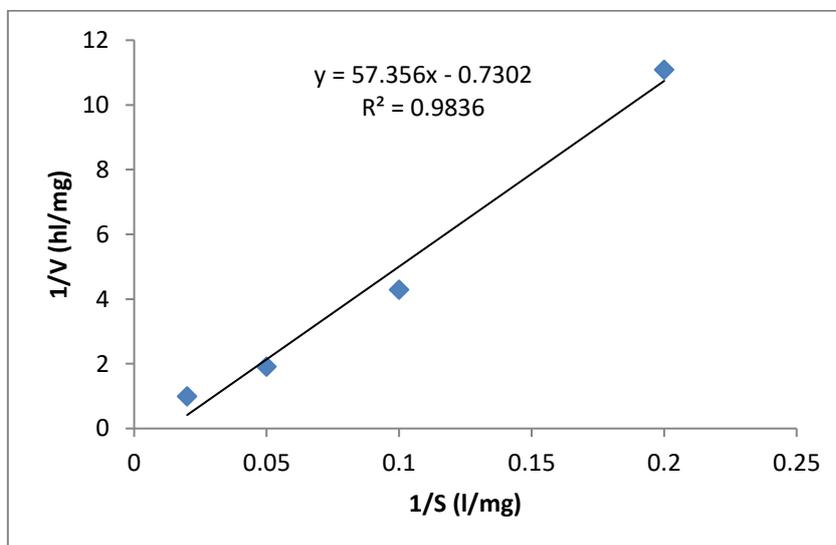


Figure 93 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la décoloration enzymatique de VM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

➤ Représentation graphique d'Eadie-Hofstee :

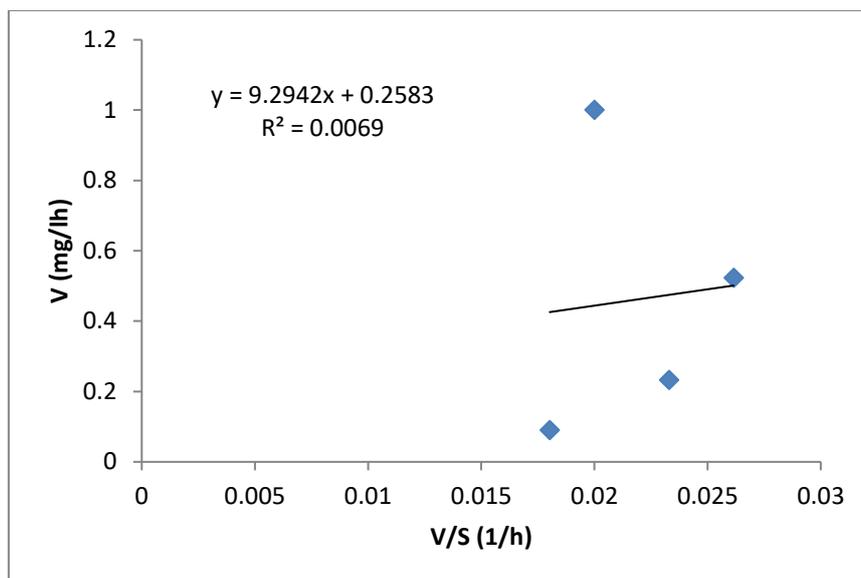


Figure 94: Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la décoloration enzymatique de VM par BP2 pour une température de 37° C et un pH=7 .

Les données expérimentales montrent que la présentation graphique de Lineweaver-Burk est la mieux adéquate pour déterminer V_{max} et K_m vue les valeurs de R^2 élevées de 0,9822, 0,9817 et 0,9836 pour BC1, BP1 et BP2 respectivement par rapport à celle d'Eadie-Hofstee ou les valeurs de corrélations ne dépassent pas 0.333.

Tableau 18 : Comparaison des valeurs de K_m et V_{max} pour la décoloration enzymatique du colorant VM par les différentes bactéries :

Bactéries	K_m (mg/l)	V_{max} (mg/lh)	R^2
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> BC1	62,882556	0,88503407	0,9822
<i>Acinetobacter Johnson II</i> BP1	42,2930558	0,54209357	0,9817
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> BP2	78,5483429	1,36948781	0,9836

II.6 Dégradation des colorants Bleu de méthylène et le vert de malachite par le consortium bactériens (BC1, BP1 et BP2) :

II.6.1 Influence de la concentration initiale :

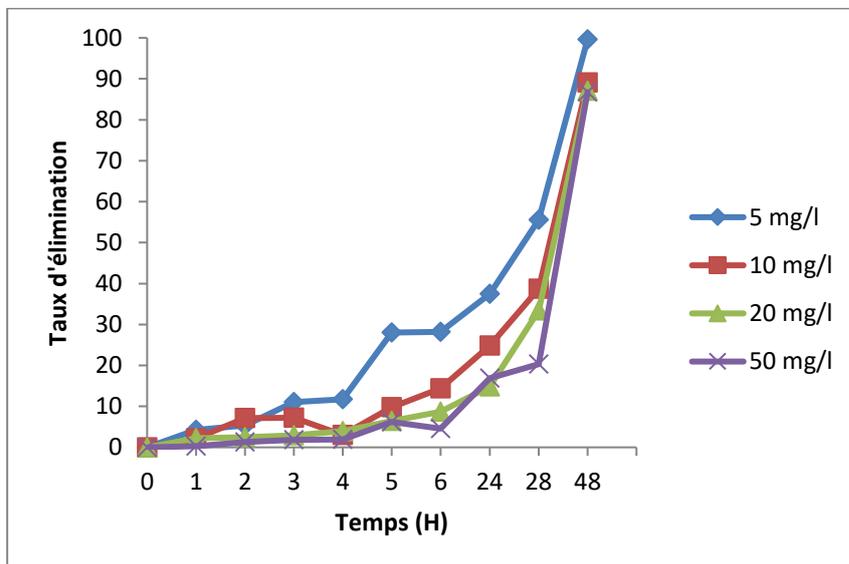


Figure 95 : Influence de la concentration initiale sur la dégradation du bleu de méthylène par le consortium bactérien pour une température de 37° C et un pH=7 .

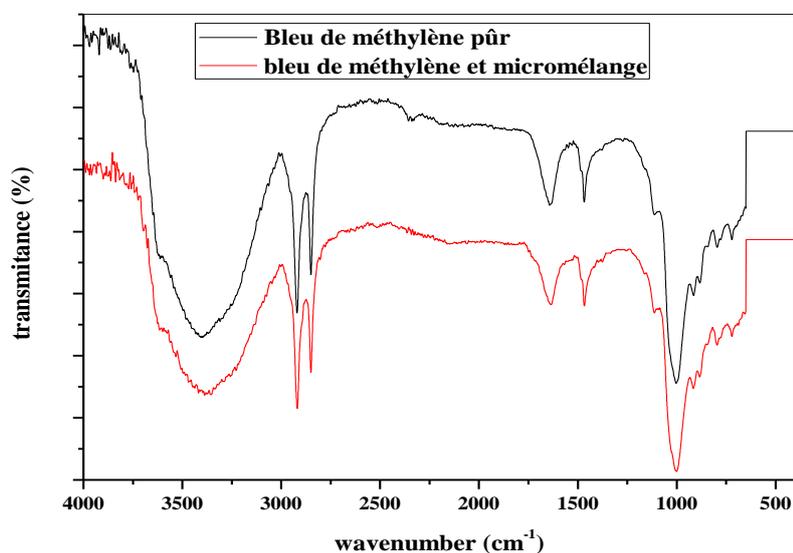


Figure 96: Spectre FTIR du bleu de méthylène (C_{init}=10mg/l) avant et après dégradation par le consortium bactérien.

La figure 95 représente le taux d'élimination du bleu de méthylène par le consortium bactérien (BP1 +BP2+BC1) en fonction du temps, on remarque que la dégradation est faible dans les premiers 6 heures 28% par rapport à la dégradation par une seule bactérie (55% par BC1, 57% par BP1 et 50% par BP2) pour une concentration initiale de 5mg/l, puis elle augmente jusqu'à une dégradation de 99% après 48h d'incubation. De ces résultats on peut dire que le consortium bactérien nécessite un temps latence pour s'adapter au milieu.

La biodégradation du bleu de méthylène par le consortium bactérien a donnée de très bons résultats pour toutes les concentrations initiales 99.64%, 89%, 87% et 86.75% pour des concentrations initiales de 10,20,30 et 50 mg/l respectivement pendant 48h d'incubation bien meilleurs que ceux trouvés avec les bactéries seuls. La même conclusion a été trouvée par Khehra et al 2005 [91], ces résultats sont confirmés par l'analyse IR du bleu de méthylène avant et après dégradation par le consortium bactérien (Fig 96).

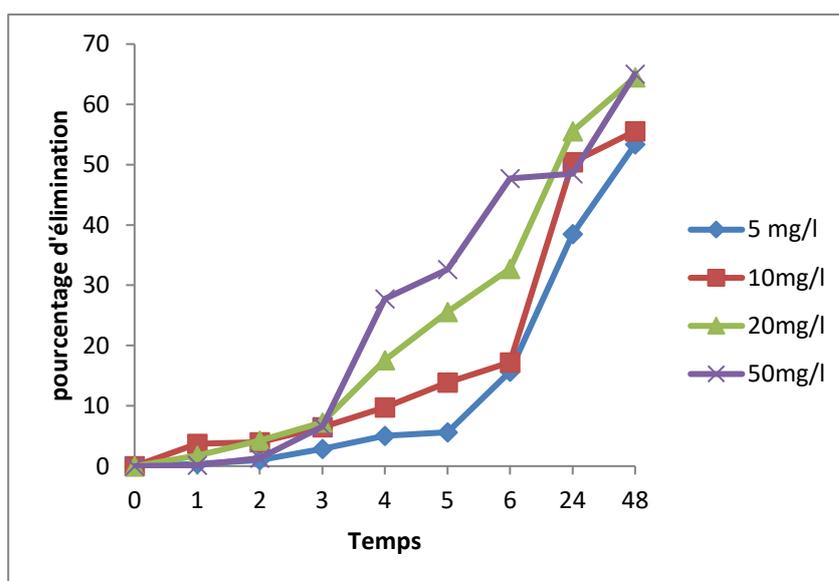


Figure 97 : Influence de la concentration initiale sur la dégradation du vert de malachite par le consortium bactérien pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 .

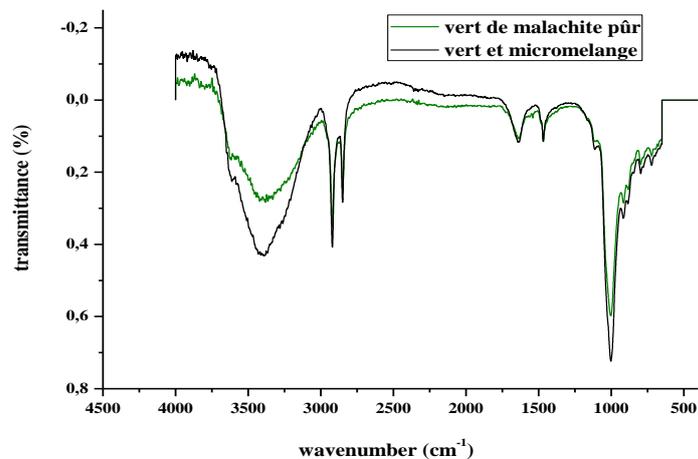


Figure 98 : Spectre FTIR du vert de malachite (Cinit=10mg/l) avant et après dégradation par le consortium bactérien.

Contrairement au bleu de méthylène le consortium bactérien n'améliore pas la dégradation du vert de malachite sauf pour les concentrations faibles 5 et 10 mg/l comme le montre la figure 97 , l'analyse par infrarouge confirme la biodégradation du VM vue les variations dans la région des empreintes digitales (1 500– 500 cm-1) entre la spectroscopie FTIR d'avant et après la dégradation par le consortium bactérien (figure 98).

II.6.2 Influence de la température :

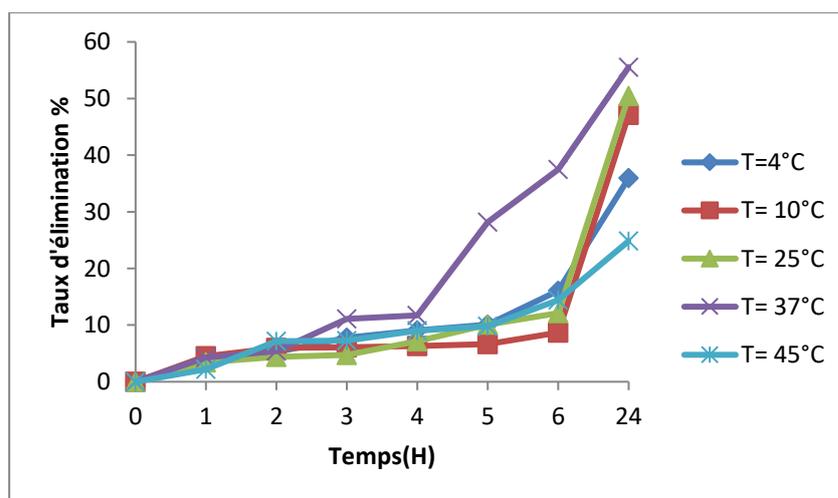


Figure 99: Influence de la température sur la dégradation du bleu de méthylène par le consortium bactérien pour une concentration initiale de 10mg/l et un pH=7

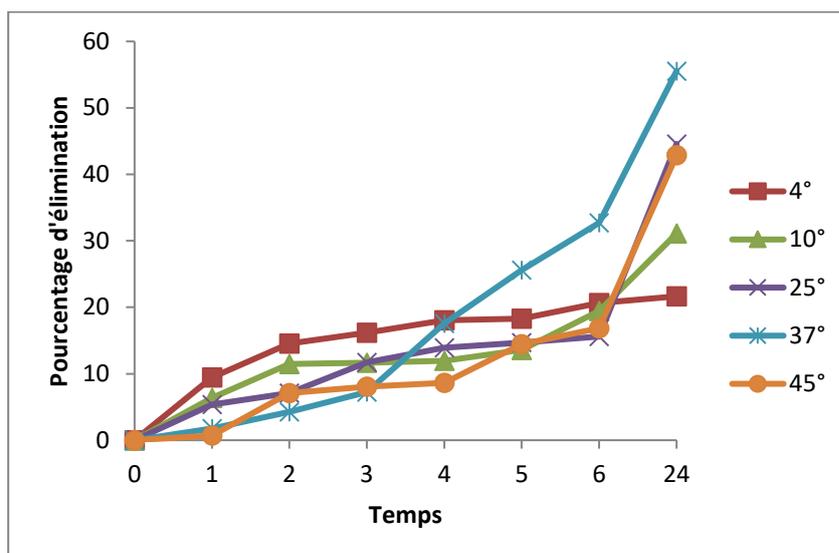


Figure 100: Influence de la température sur la dégradation du vert de malachite par le consortium bactérien pour une concentration initiale de 10mg/l et un pH=7.

D'après les figures 99 et 100 on a constaté que la dégradation est bien meilleure à une température de 37° (55% et 66% d'élimination de bleu de méthylène et le vert de malachite respectivement), les mêmes résultats trouvés par les bactéries seuls.

II.6.3 Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par le consortium bactérien :

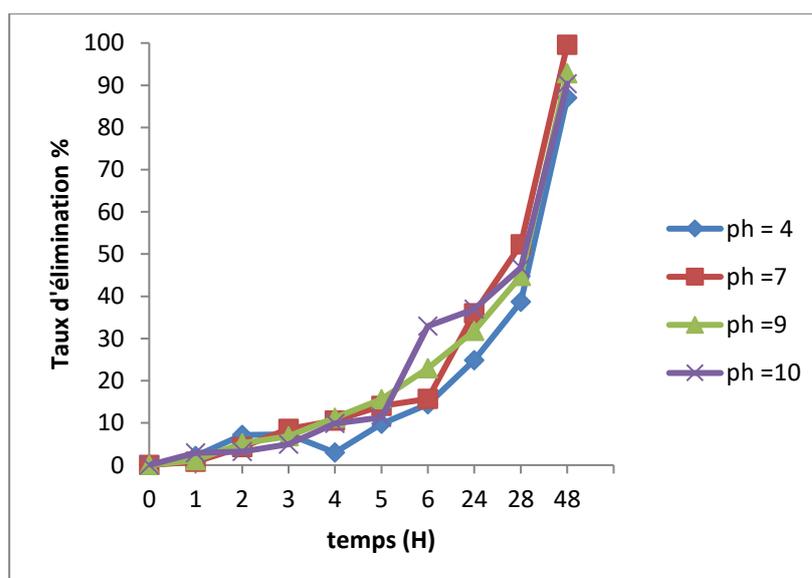


Figure 101: Influence du pH sur la dégradation du bleu de méthylène par le consortium bactérien pour une concentration initiale de 10mg/l et une température de 37° C

D'après la figure 101 on a observé que la dégradation est élevée pour tous les pH pendant 48h d'incubation avec une faible différence (87, 99, 92 et 90% d'élimination pour ph de 4, 7, 9 et 10 respectivement). Pendant les premières 6 heures on a eu une faible dégradation, cela est due au temps latence pour que les bactéries s'adaptent au milieu.

II.7 Immobilisation des bactéries :

Dans cette partie on a etudier la dégradation des colorants bleu de methylene et le vert de malachite par les bactéries *Pseudomonas chlororaphis* BC1, *Acinetobacter Johnson II* BP1 et *Bacillus weihenstephanensis* BP2 ainsi que le consortium immobilisés par l'Alginate de sodium.

II.7.1 Dégradation du bleu de méthylène par les bactéries et consortium immobilisés :

II.7.1.1 Influence de l'immobilisation sur la dégradation du BM :

Les figures 102, 104, 106 et 108 représentent le taux d'élimination du BM par BC1, BP1, BP2 et le consortium immobilisé en fonction du temps à une température de 37°C et un pH de 7.

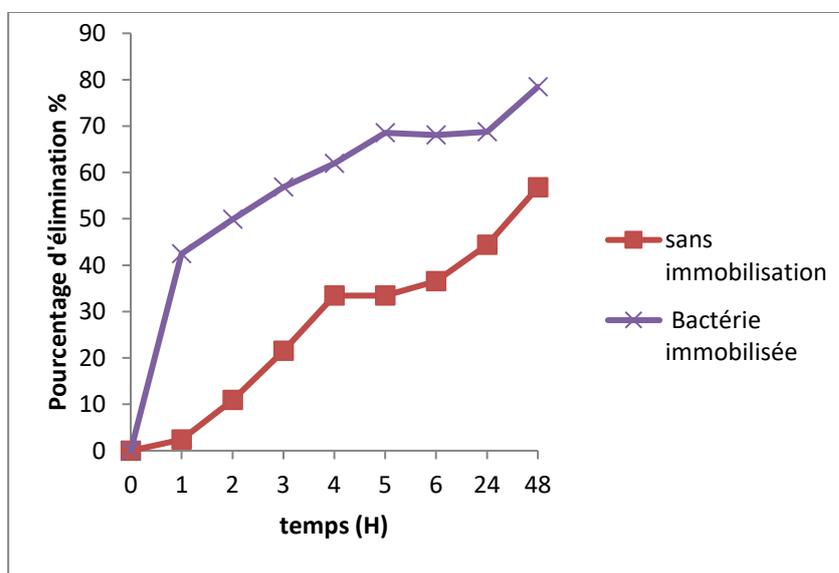


Figure 102: Influence de l'immobilisation de la bactérie BC1 sur l'élimination du BM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

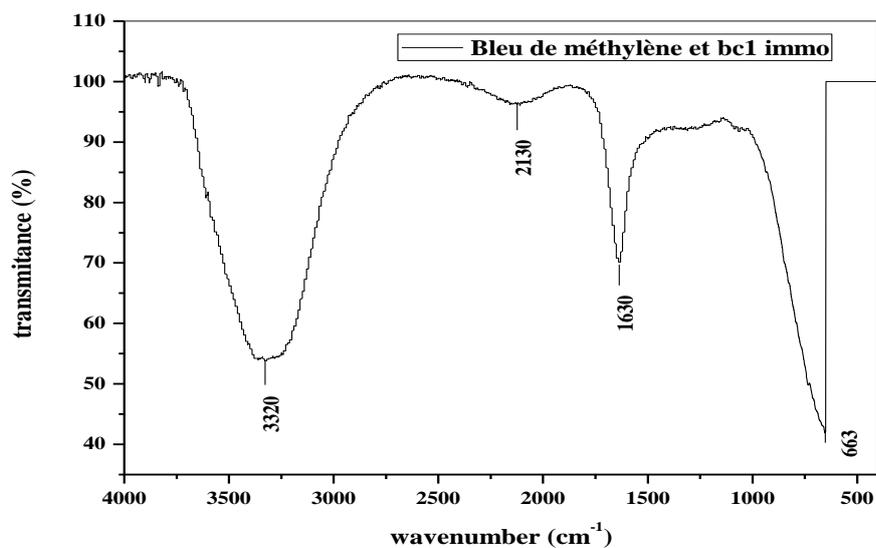


Figure 103 : Spectre FTIR du bleu de méthylène après dégradation par BC1 immobilisée

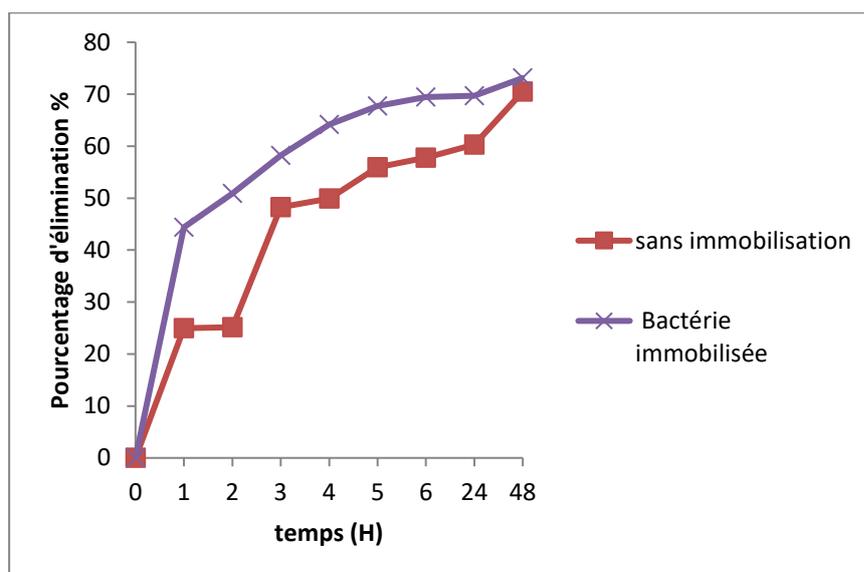


Figure 104: Influence de l'immobilisation de la bactérie BP1 sur l'élimination du BM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

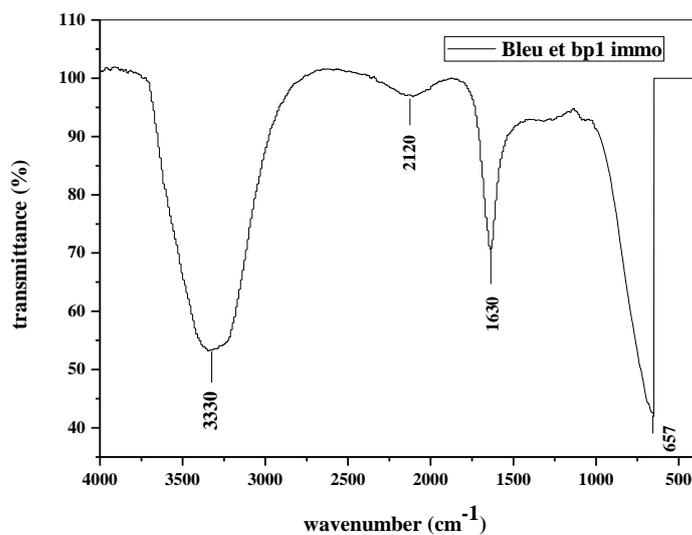


Figure 105: Spectre FTIR du bleu de méthylène après dégradation par Bp1 immobilisée

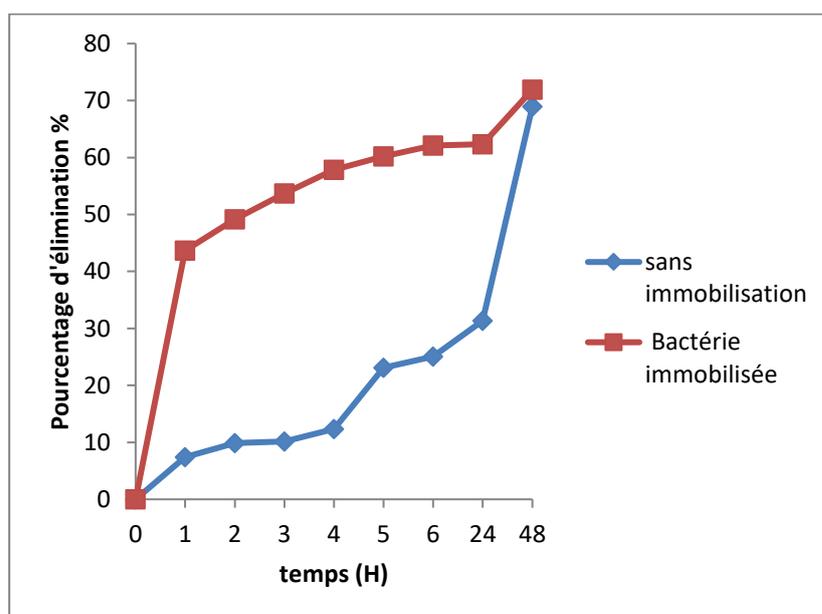


Figure 106: Influence de l'immobilisation de la bactérie BP2 sur l'élimination du BM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

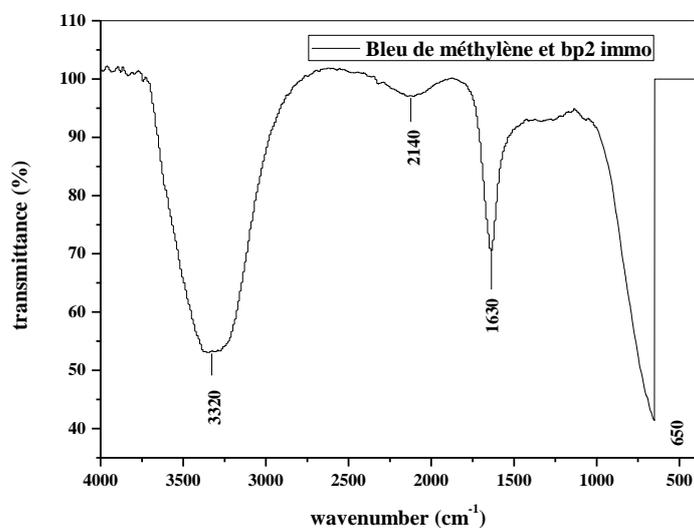


Figure 107 : Spectre FTIR du bleu de méthylène après dégradation par BP2 immobilisée.

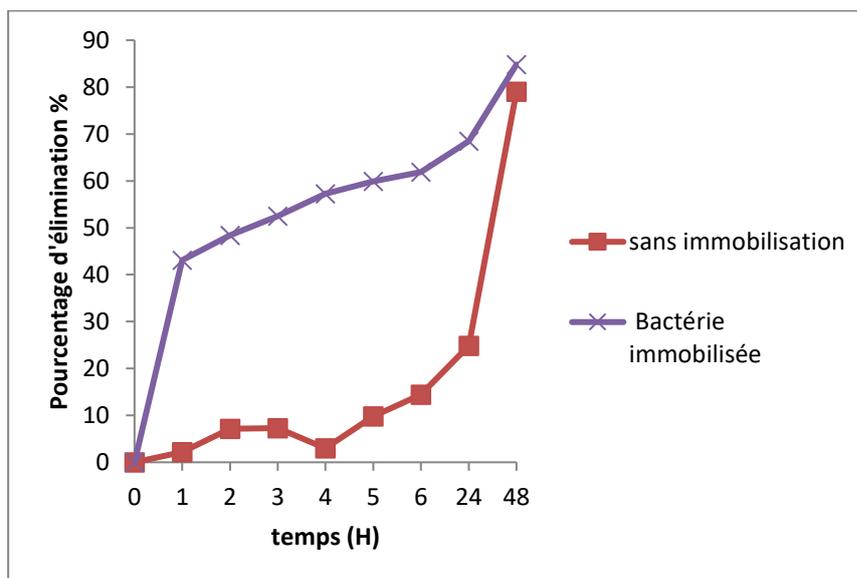


Figure 108 : Influence de l'immobilisation du micro-Mélange sur l'élimination du BM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

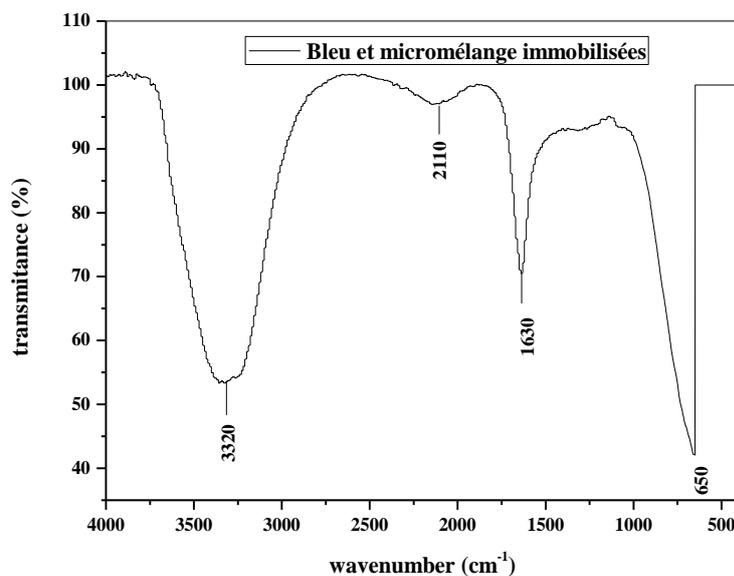


Figure 109: Spectre FTIR du bleu de méthylène après dégradation par le micro-mélange immobilisé

Les figures précédentes montrent une nette amélioration de l'élimination du bleu de méthylène par les trois bactéries et par le consortium immobilisés (78,73, 71 et 85 pour BC1, BP1, BP2 et le consortium immobilisés respectivement par rapport 57,69,68 et 79 % sans immobilisation), aussi les bactéries et le consortium immobilisés nécessitent pas un temps de latence pour dégrader le colorant, le même résultat est obtenu par [105, 154] .

Les cellules bactériennes immobilisées ont acquis certains avantages, le plus important est le niveau très élevé de la production des enzymes extracellulaires nécessaire pour la biodégradation des colorants, la protection des bactéries de l'extérieur (milieux agressifs), possibilité de réutilisation des billes [105] .

Les spectres FTIR du bleu de méthylène après dégradation par les bactéries et le consortium immobilisées (Fig 103, 105, 107 et 109) présentent des variations importantes dans les fréquences IR par rapport à celui du bleu de méthylène pur (Fig 27), ou on a de nouveaux pics vers 650 cm^{-1} pour l'étirement C-Cl et des pics vers 2140 pour l'étirement de C-C ainsi que la disparition de plusieurs pics comme celui vers 2923 cm^{-1} , 2840 cm^{-1} pour l'étirement C-H, 1460 cm^{-1} pour l'étirement , 1000 cm^{-1} pour l'étirement C-N de l'amine , 720 cm^{-1} et 795 cm^{-1} pour l'étirement C-H aromatique disubstitué méta 1^{ère} et 2^{ème} bande. Ce qui montre une biodégradation totale du BM avec élimination de certaines fonctions et apparition de fonctions nouvelles.

II.7.1.2 Influence du nombre de billes sur la dégradation du bleu de méthylène :

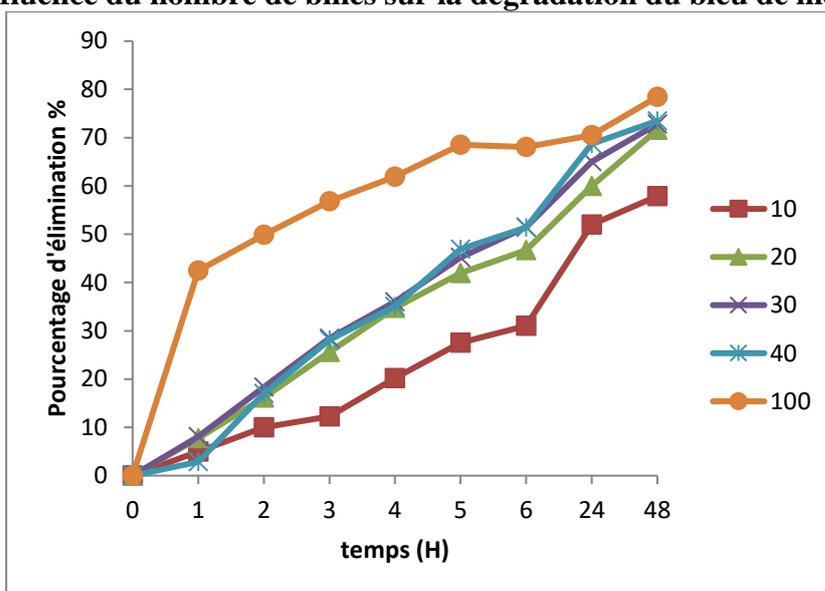


Figure 110 : Influence du nombre de billes du BC1 sur l'élimination du bleu de méthylène pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

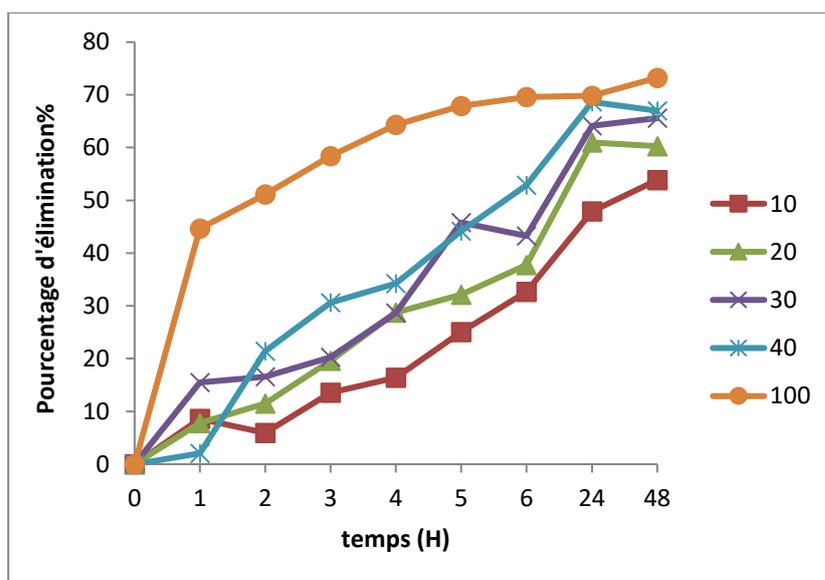


Figure 111 : Influence du nombre de billes du BP1 sur l'élimination du bleu de méthylène pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

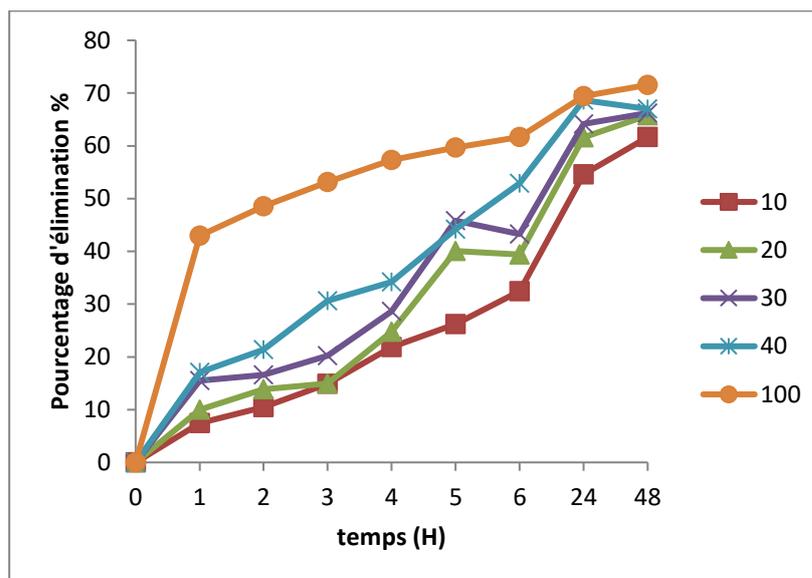


Figure 112: Influence du nombre de billes du BP2 sur l'élimination du bleu de méthylène pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7.

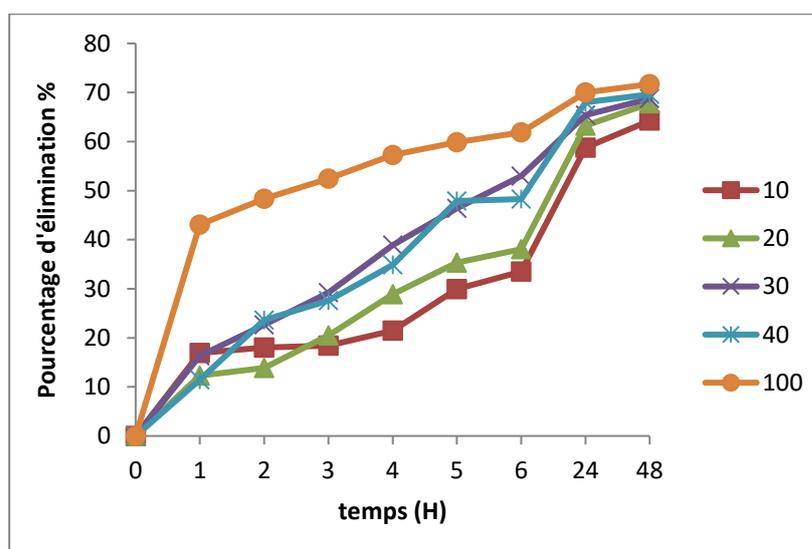


Figure 113: Influence du nombre de billes du Micro-Mélange sur l'élimination du bleu de méthylène pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7.

D'après les figures 110, 111, 112 et 113 on a constaté que plus on augmente le nombre de billes plus la biodégradation augmente pour la bactérie BC1 on a obtenu un pourcentage d'élimination de 58, 72, 73, 74 et 79, pour la bactérie BP1 on a 54, 60, 65, 67 et 73% d'élimination pour 10, 20, 30, 40 et 100 billes respectivement, pour la bactérie BP2 le taux de dégradation est de 61, 65, 66, 67 et 71% et pour le consortium on a obtenu 64, 67, 68, 69 et 71 % pour un nombre de billes respectivement de 10, 20, 30, 40 et 100. L'augmentation du nombre de billes fait croître le nombre des sites disponibles pour la fixation du colorant, ce qui favorise par conséquent le phénomène de biodégradation.

II.7.1.3 Influence de l'agitation sur la dégradation du bleu de méthylène par les bactéries immobilisées :

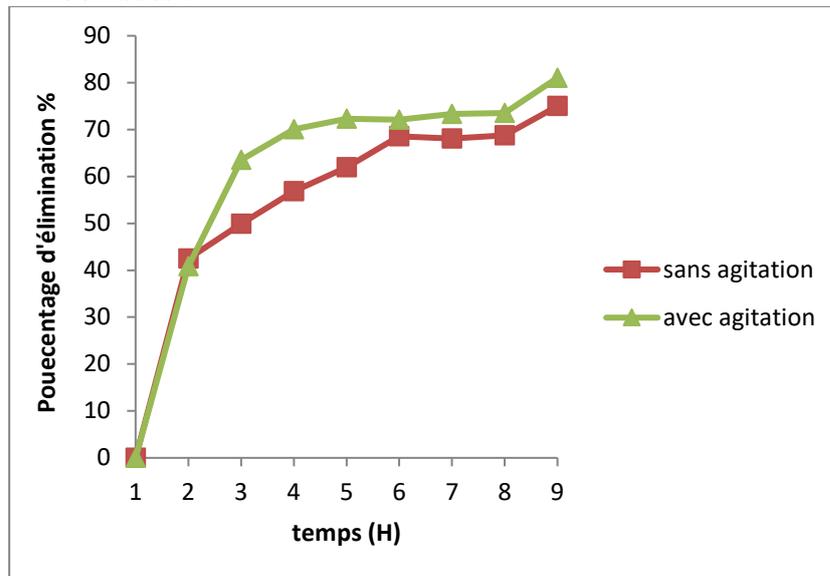


Figure 114: Influence de l'agitation sur l'élimination du BM par BC1 immobilisée pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une agitation de 100 tour/min

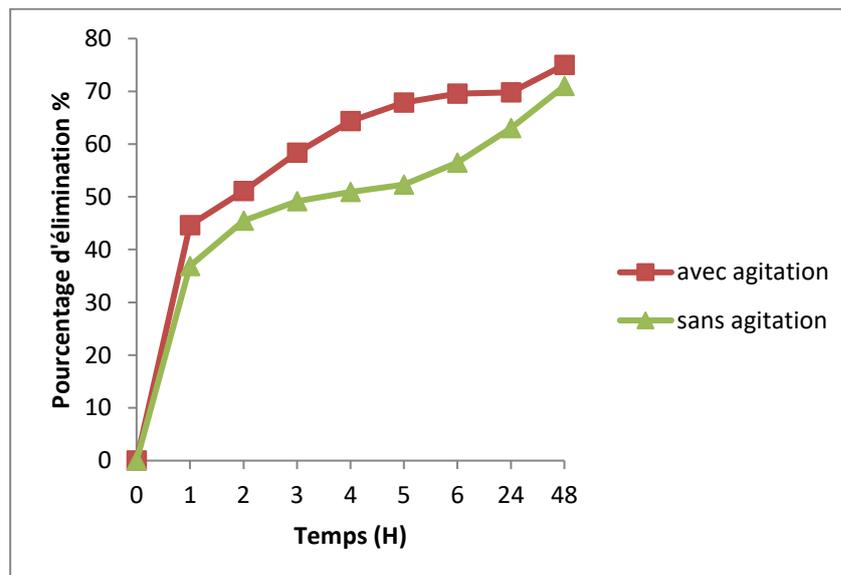


Figure 115: Influence de l'agitation sur l'élimination du BM par BP1 immobilisée pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une agitation de 100 tour/min

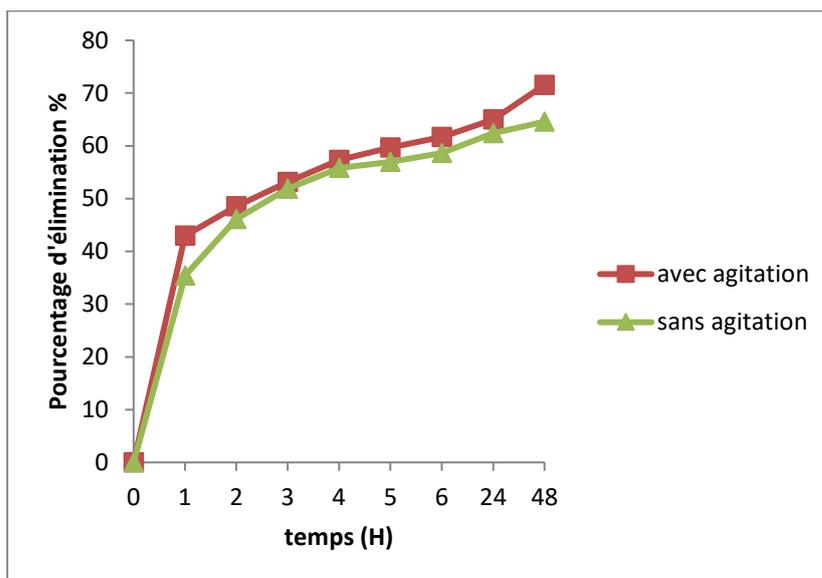


Figure 116: Influence de l'agitation sur l'élimination du BM par BP2 immobilisée pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une agitation de 100 tour/min

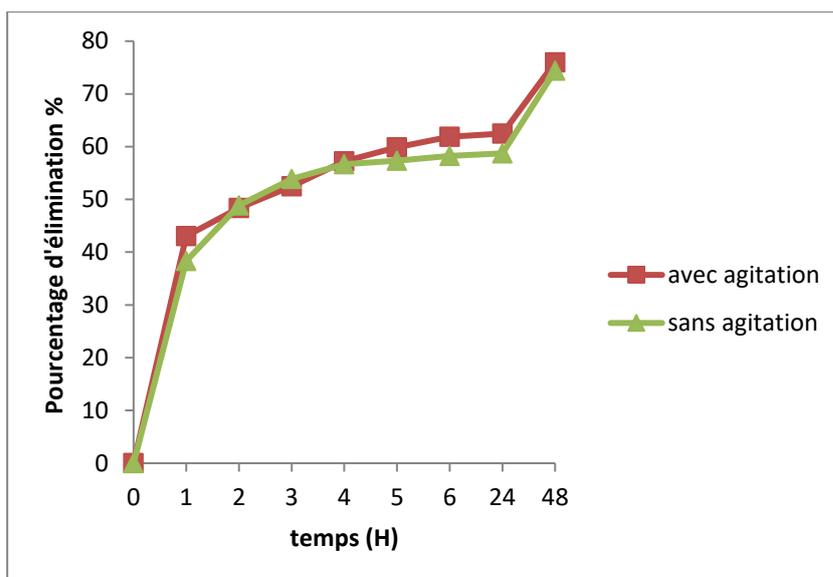


Figure 117: Influence de l'agitation sur l'élimination du BM par le consortium immobilisé pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une agitation de 100 tour/min

Les résultats obtenus (figures 114, 115, 116 et 117) montrent que l'agitation améliore la dégradation du colorant (75, 71, 64 et 74% d'élimination sans agitation par contre 81, 75, 71 et 76% avec agitation par BC1, BP1, BP2 et le consortium immobilisées respectivement).

L'agitation a pour effet d'homogénéiser la solution et de favoriser le contact des billes avec le colorant ainsi amélioré la décoloration.

II.7.2 Dégradation du vert de malachite par les bactéries et consortium immobilisés :

II.7.2.1 Influence de l'immobilisation sur la dégradation du VM :

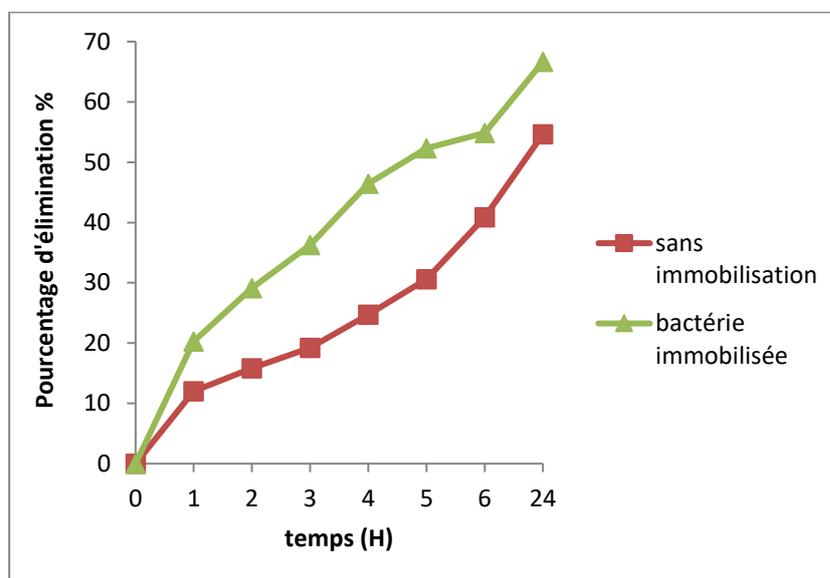


Figure 118: Influence de l'immobilisation du BC1 sur l'élimination du vert de Malachite pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

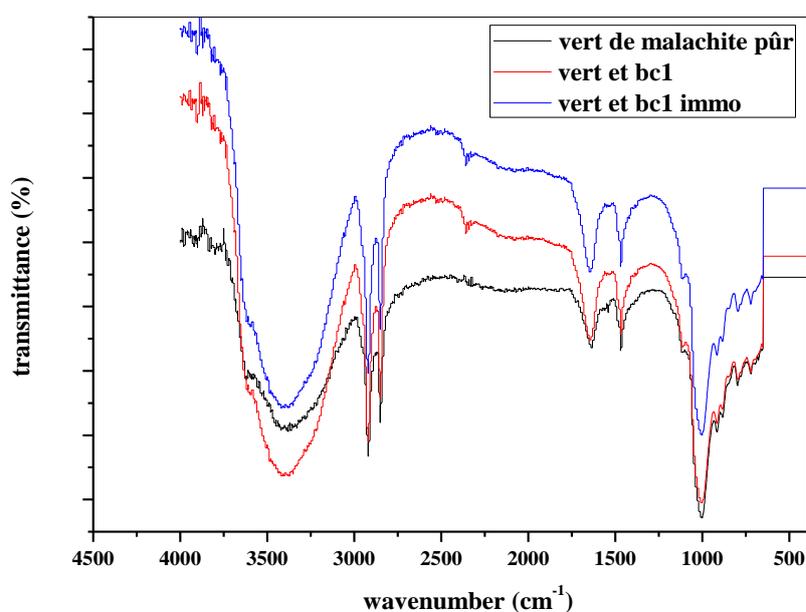


Figure 119 : Spectre FTIR du vert de malachite après dégradation par BC1 avant et après immobilisation.

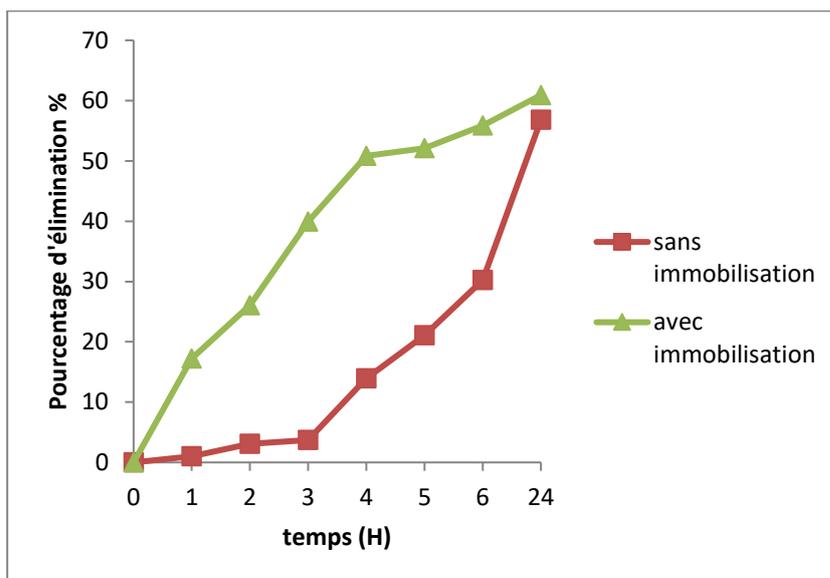


Figure 120: Influence de l'immobilisation du PB1 sur l'élimination du VM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une agitation de 100 tour/min

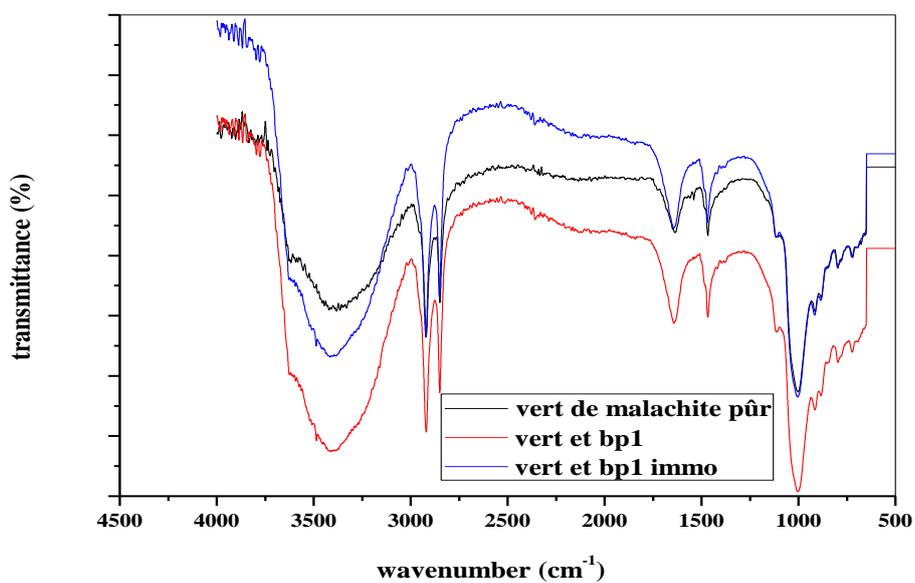


Figure 121 : Spectre FTIR du vert de malachite après dégradation par BP1 avant et après immobilisation.

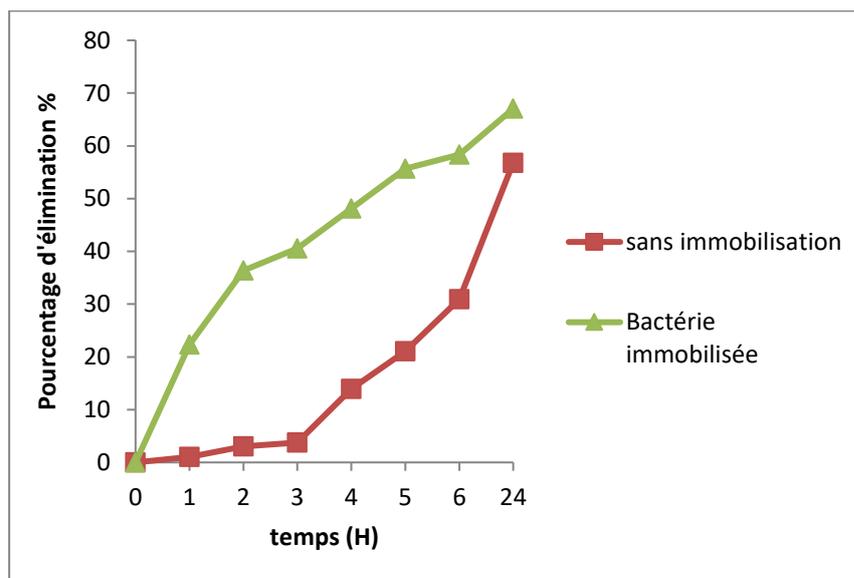


Figure 122: Influence de l'immobilisation du BP2 sur l'élimination du VM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

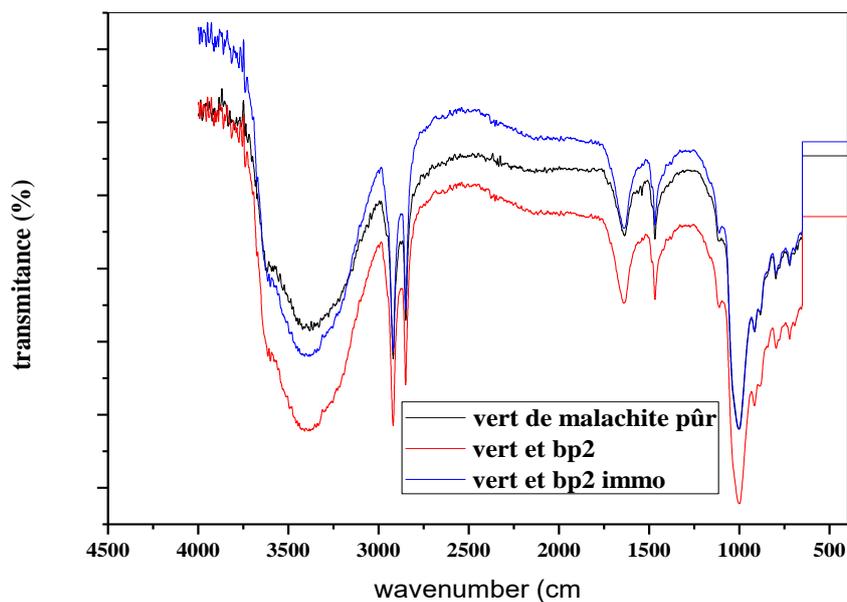


Figure 123: Spectre FTIR du vert de malachite après dégradation par BP2 avant et après immobilisation

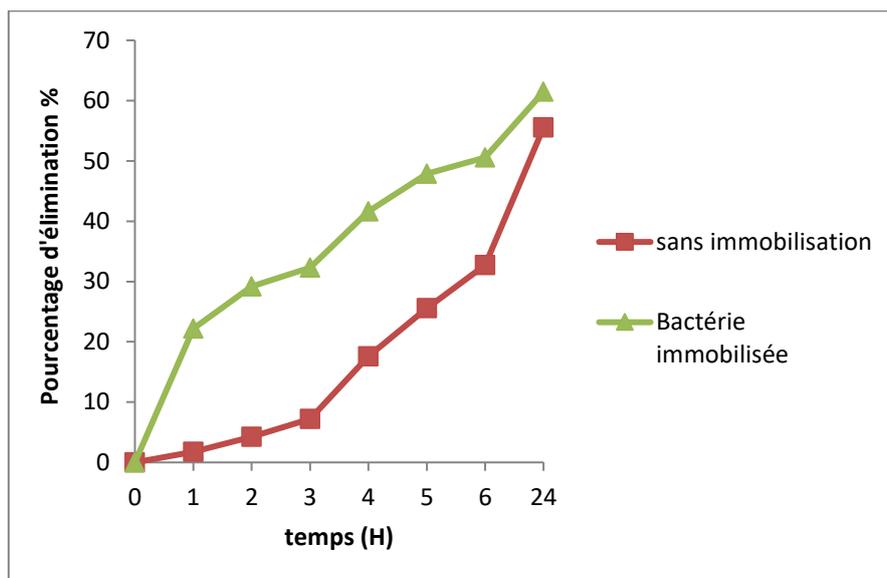


Figure 124: Influence de l'immobilisation du consortium bactérien sur l'élimination du VM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une

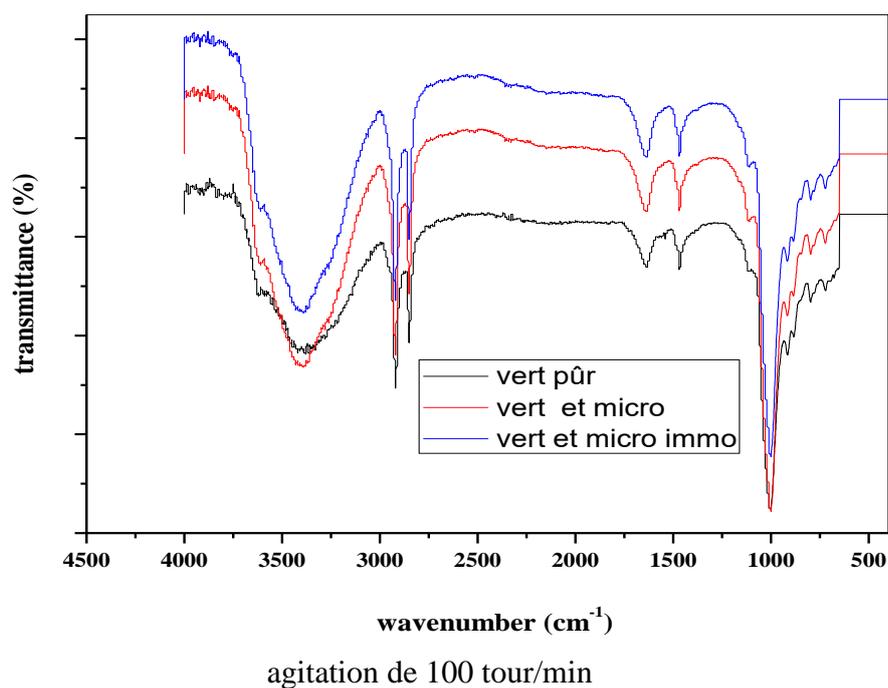


Figure 125: Spectre FTIR du vert de malachite après dégradation par le micro mélange avant et après immobilisation.

L'immobilisation des bactéries et le consortium améliore nettement la dégradation du vert de malachite, pour la bactérie BC1 le taux d'élimination est de 54% pendant 24h d'incubation avant l'immobilisation par contre après l'immobilisation il est de 66%, pour BP1

on a un taux de 56% sans immobilisation et de 61% d'élimination par la bactérie immobilisée, la bactérie BP2 sans immobilisation a dégradé le VM à 56% par contre immobilisée a éliminé le colorant à 67% et le consortium bactérien a un taux d'élimination de 55% avant immobilisation et 61% après immobilisation. De là on peut conclure que l'immobilisation des bactéries et du consortium améliore l'activité de ses derniers dans les deux colorants soit pour le bleu de méthylène que pour le vert de malachite et ce résultat est confirmé par l'analyse par spectroscopie infrarouge.

II.7.2.2 Influence du nombre de billes des bactéries BC1, BP1, BP2 et le consortium immobilisés sur la dégradation du VM :

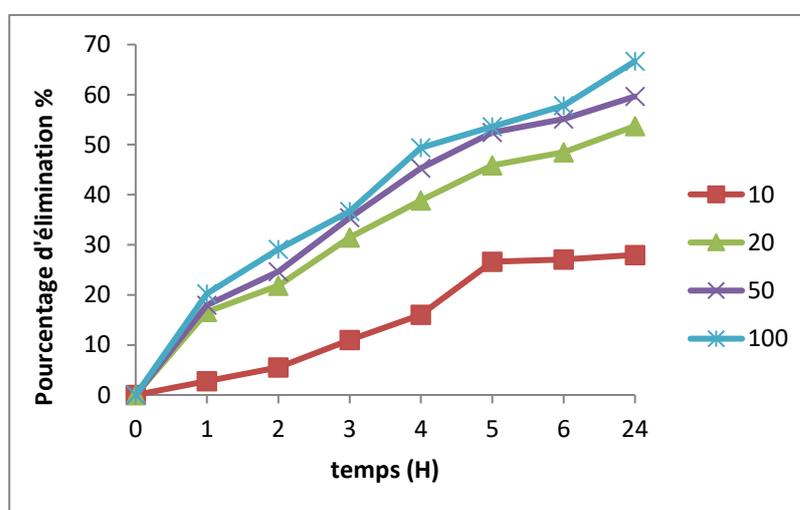


Figure 126: Influence du nombre de billes de BC1 sur l'élimination du VM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

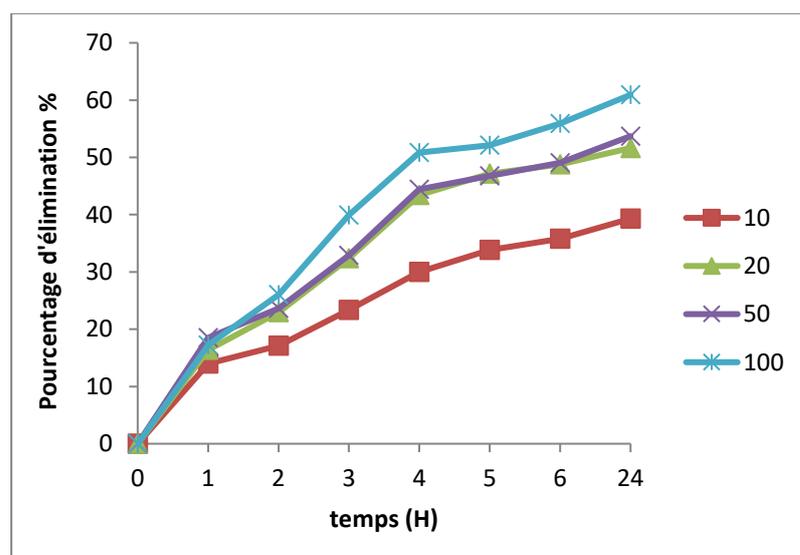


Figure 127: Influence du nombre de billes de BP1 sur l'élimination du VM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

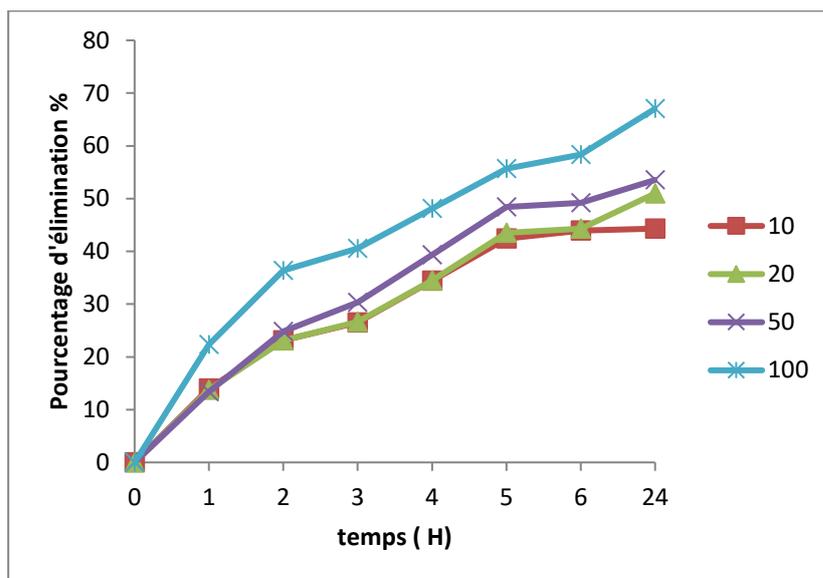


Figure 128: Influence du nombre de billes de BP2 sur l'élimination du VM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

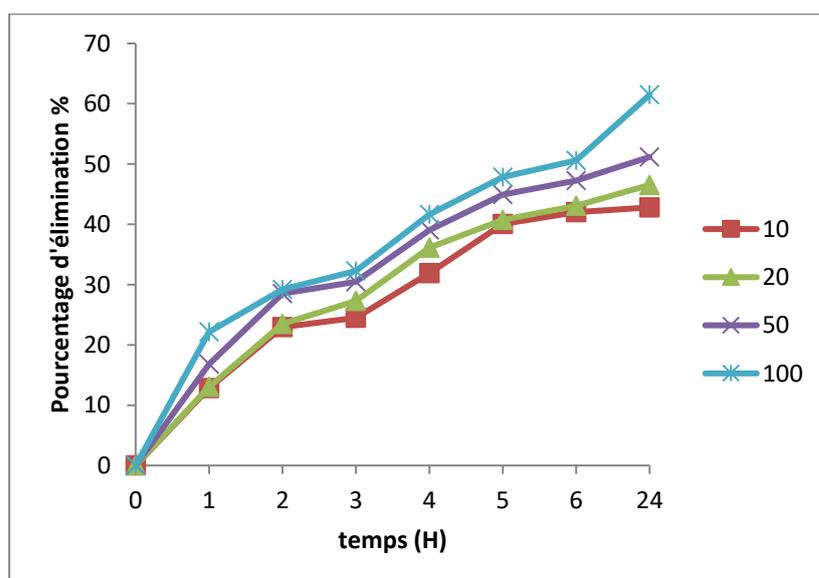


Figure 129: Influence du nombre de billes du consortium sur l'élimination du VM pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7

L'augmentation du nombre de billes des bactéries et du consortium immobilisés augmente le taux de dégradation du vert de malachite (pour BC1 on a des taux d'éliminations de 28,54,59,67%, pour BP1 on a 39,51,54,61%, pour BP2 on a 44,51,54 et 67% et pour le consortium 43,47,51 et 62% d'élimination avec 10, 20,50 et 100 billes respectivement).

Ce qui confirme le résultat qu'on a trouvé avec le bleu de méthylène, l'augmentation du nombre de billes fait croître la quantité des bactéries ainsi que les sites disponibles pour la fixation du colorant.

II.7.2.3 Influence de l'agitation sur la dégradation du VM :

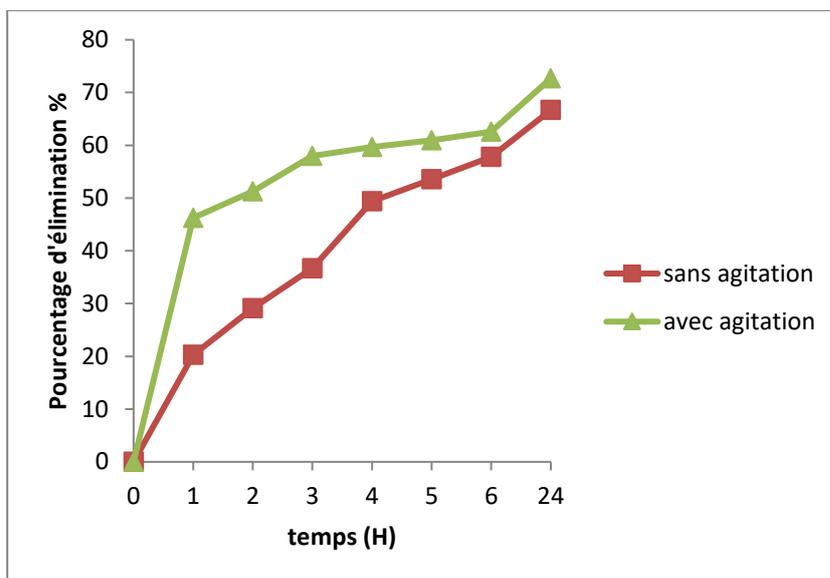


Figure 130: Influence de l'agitation sur l'élimination du VM par BC1 immobilisée pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une agitation de 100 tour/min

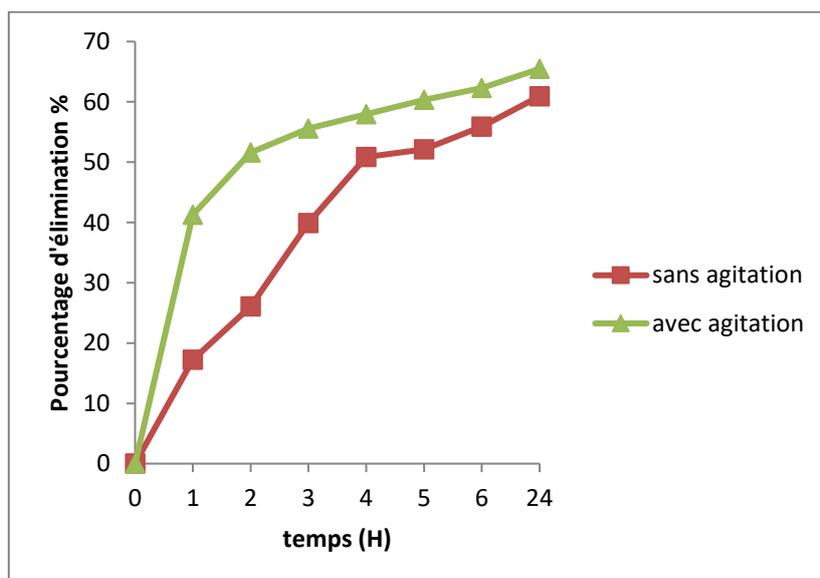


Figure 131: Influence de la vitesse d'agitation sur l'élimination du VM par BP1 immobilisée pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une agitation de 100 tour/min

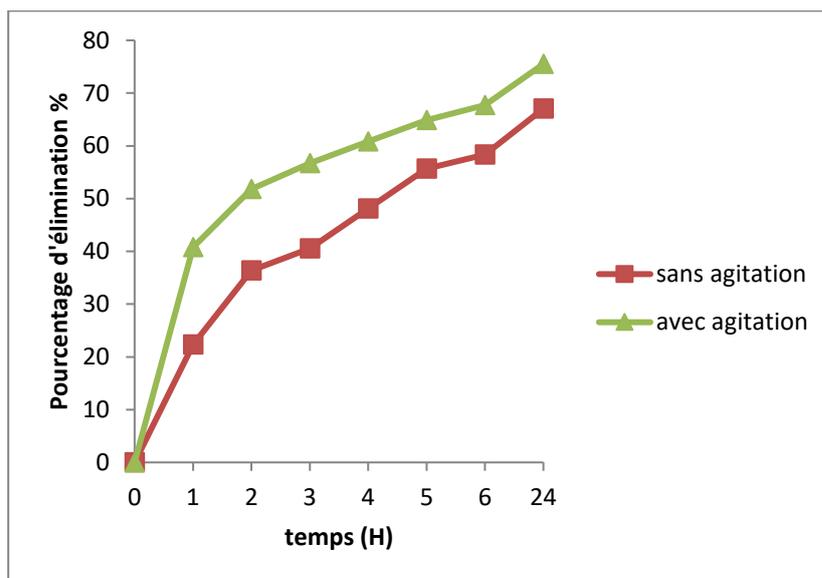


Figure 132: Influence de l'agitation sur l'élimination du VM par BP2 immobilisée pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une agitation de 100 tour/min

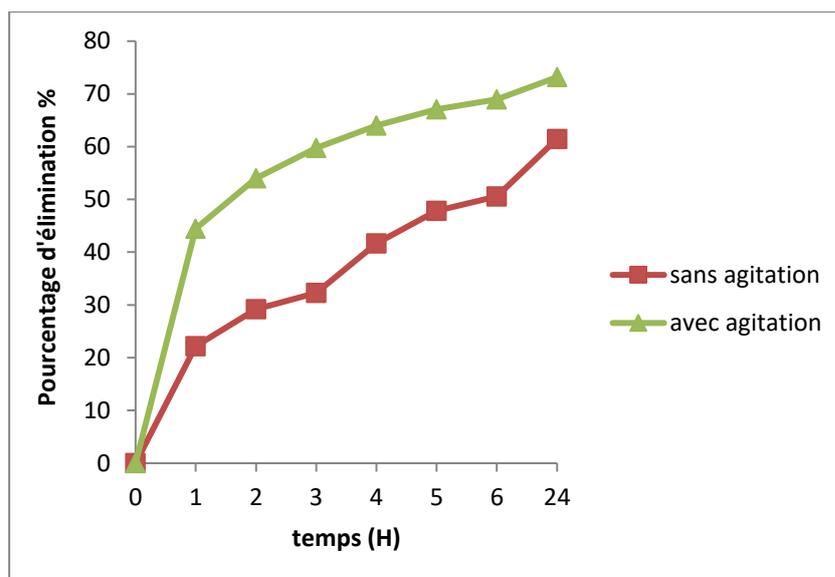


Figure 133: Influence de l'agitation sur l'élimination du VM par le consortium immobilisé pour une concentration initiale de 10mg/l, une température de 37° C et un pH=7 avec une agitation de 100 tour/min

D'après les figures 130, 131, 132 et 133 on a constaté que l'agitation améliore nettement la dégradation du vert de malachite (la dégradation était avant l'agitation par la bactérie BC1 66%, par BP1 61%, par BP2 67 et par le consortium 61% par contre après l'agitation est de 72, 66, 76 et 73 % d'élimination par BC1, BP1, BP2 et par le consortium respectivement). Le même constat qu'on a trouvé avec le bleu de méthylène, l'agitation a améliorée le contact des billes avec le colorant ainsi améliorée la dégradation.

Conclusion générale

Conclusion générale :

Nos recherches ont porté sur la dégradation des colorants par des bactéries isolées à partir de produit agroalimentaires, après plusieurs essais on a choisis la betterave rouge comme source agroalimentaires vue le développement microbien important qu'elle favorise.

Elles ont eu pour objectif d'étudier l'élimination de deux colorants cationique le bleu de méthylène et le vert de malachite en solution aqueuse par des bactéries isolées à partir de la chair et de l'épluchure de la betterave rouge.

On premier lieu on a isolé trois bactéries qui ont une très grande capacité à dégrader les colorants une (01) à partir de la chair et deux (02) à partir de la peau, ces bactéries ont été identifiées comme *Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca CIP 106718T HAM* pour la bactérie BC1, la bactérie BP1 comme *Acinetobacter Johnson II* et la bactérie BP2 comme *Bacillus weihenstephanensis*.

On deuxième lieu on a étudié la dégradation des colorants du bleu de méthylène ainsi que du vert de malachite par ces bactéries sous différentes conditions de concentration, de pH et de température d'incubation ainsi que la présence de source de carbone et d'azote dans le milieu.

Les résultats obtenus indiquent que:

➤ Une forte élimination des deux colorants par les bactéries BC1, BP1 et BP2, la bactérie *Bacillus weihenstephanensis* BP2 à donner un résultat plus important dans la dégradation du bleu de methylene par contre la bacterie *Pseudomonas chlororaphis* BC1 a mieux dégradée le vert de malachite.

➤ Plus la concentration initiale du BM augmente plus le pourcentage d'élimination diminue (70, 80 et 97% d'élimination du BM pour une concentration initiale de 5mg/l par BC1, BP1 et BP2 respectivement par contre on a un taux d'élimination de 59, 63 et 70% par BC1, BP1 et par BP2 pour une concentration initiale de 100 mg/l), a l'opposé du vert de malachite ou plus la concentration initiale du colorant augmente plus le taux de dégradation augmente (pour une $C_{int}=5$ mg/l on a un taux d'élimination de 35, 30 et 38% et pour $C_{int}= 50$ mg/l on a un taux d'élimination de 80, 70 et 76% par BC1, BP1 et BP2 respectivement).

➤ Le pH optimal pour la dégradation du bleu de méthylène par les trois bactéries est du 7.

➤ Le taux de dégradation du bleu de méthylène et du vert de malachite est bien meilleur à une température d'incubation de 37°C par les trois bactéries et La bactérie *Bacillus weihenstephanensis* BP2 s'adapte à toutes conditions de température mieux que les bactéries *Pseudomonas chlororaphis* BC1 et *Acinetobacter Johnson II* BP1

➤ L'ajout d'une Source de carbone au milieu a un effet positive sur la dégradation du bleu de méthylène par contre, il a un effet négatif sur la dégradation du vert e malachite sauf par la bactérie BP2 , L'ajout de la source d'azote au milieu influe négativement sur la dégradation des deux colorants sauf pour BP2 qui a besoin d'une source d'azote pour mieux dégrader le vert de malachite.

➤ L'étude cinétique de biodégradation a montré que la dégradation enzymatique des colorants BM et VM par les trois bactéries suit un modèle cinétique du premier ordre avec des vitesses moyennes de 81,30 mg/lh, 1,02 mg/lh et 4 mg/lh pour le bleu de méthylène par BC1,BP1 et BP2 respectivement et pour le vert de malachite des vitesse moyennes de 0,88 mg/lh, 0,54 mg/lh et 1,37 mg/lh par BC1,BP1 et BP2 respectivement.

On troisièmes lieu on a étudié la dégradation des deux colorants par un consortium bactériens constitué par les trois bactéries ensemble (BC1, BP1et BP2), les résultats ont montrés que le consortium bactériens a donné de très bons résultats pour toutes les concentrations initiales du bleu de méthylène (99.64%, 89%, 87% et 86.75% pour des concentrations initiales de 10,20,30 et 50 mg/l respectivement pendant 48h d'incubation en revanche il n'a pas amélioré la dégradation du vert de malachite sauf pour les concentrations faibles de 5 et de10 mg/l et que les conditions optimales de température et de pH sont respectivement de 37°c et de 7 pour une meilleur élimination des deux colorants par le consortium bactériens.

Finalement on a expérimenté la dégradation des colorants (BM et VM) par les bactéries (BC1, BP1, BP2 et le consortium bactériens) immobilisées dans l'alginate de sodium, il a été constaté ce qui suit :

➤ une nette amélioration de l'élimination du bleu de méthylène et du vert de malachite par toutes les bactéries ainsi que pour le consortium immobilisés.

➤ L'augmentation du nombre de billes augmente le taux de dégradation des deux colorants ainsi que l'application d'une agitation améliore nettement la dégradation.

En perspectives, il serait intéressant d'approfondir cette étude en essayant d'optimiser les paramètres influençant la biodégradation des colorants par des microorganismes immobilisés ainsi son application sur un rejet liquide réel et son utilisation dans les sites de traitement industriels.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

1. Chiou, J.-R., et al., *One-pot green synthesis of silver/iron oxide composite nanoparticles for 4-nitrophenol reduction*. Journal of Hazardous Materials, 2013. **248**: p. 394-400.
2. Pabbathi, N.P.P., et al., *Environmental Metabolomics: With the Perspective of Marine Toxicology Assessment*, in *Environmental Biotechnology Vol. 12020*, Springer, Cham. p. 197-225.
3. Naz, M., et al., *Elimination of dyes by catalytic reduction in the absence of light: A review*. Journal of Materials Science, 2021. **56**(28): p. 15572-15608.
4. Tiwari, D.K., J. Behari, and P. Sen, *Application of nanoparticles in waste water treatment 1*. 2008.
5. Jiang, J.-Q. and S. Ashekuzzaman, *Development of novel inorganic adsorbent for water treatment*. Current Opinion in Chemical Engineering, 2012. **1**(2): p. 191-199.
6. Kass, A., et al., *The impact of freshwater and wastewater irrigation on the chemistry of shallow groundwater: a case study from the Israeli Coastal Aquifer*. Journal of Hydrology, 2005. **300**(1-4): p. 314-331.
7. Al Yaqout, A.F., *Assessment and analysis of industrial liquid waste and sludge disposal at unlined landfill sites in arid climate*. Waste management, 2003. **23**(9): p. 817-824.
8. Foroutan, R., et al., *Preparation of clinoptilolite/starch/CoFe₂O₄ magnetic nanocomposite powder and its elimination properties for cationic dyes from water and wastewater*. International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **189**: p. 432-442.
9. Benkhaya, S., S. M'rabet, and A. El Harfi, *Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes*. Heliyon, 2020. **6**(1): p. e03271.
10. Berradi, M., et al., *Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs*. Heliyon, 2019. **5**(11): p. e02711.
11. GUIVARCH, E. and M.A. OTURAN, *Le problème de la contamination des eaux par les colorants synthétiques: Comment les détruire? Application du procédé électro-Fenton*. L'Actualité chimique, 2004(277-78): p. 65-69.
12. Al-Degs, Y., et al., *Effect of carbon surface chemistry on the removal of reactive dyes from textile effluent*. Water Research, 2000. **34**(3): p. 927-935.

Références bibliographiques

13. Goudjil, S., et al., *Effect of reactional parameters on the elimination of Congo Red by the combination of coagulation–floculation with aluminum sulfate*. DESALINATION AND WATER TREATMENT, 2021. **209**: p. 429-436.
14. Hadjer, G. and S. Ilham, *Utilisation des bio-coagulants en traitement des eaux usées textiles*, 2020.
15. Xu, Y. and R.E. Lebrun, *Modélisation de nanofiltration/osmose inverse en tenant compte du facteur de séparations minimale et maximale*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 1999. **77**(3): p. 503-507.
16. Moradihamedani, P., *Recent advances in dye removal from wastewater by membrane technology: a review*. Polymer Bulletin, 2021: p. 1-29.
17. Saini, R.D., *Textile organic dyes: polluting effects and elimination methods from textile waste water*. Int J Chem Eng Res, 2017. **9**(1): p. 121-136.
18. Cheng, L., et al., *Efficient H₂O₂ Oxidation of Organic Dyes Catalyzed by Simple Copper(II) Ions in Bicarbonate Aqueous Solution*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2014. **53**(9): p. 3478-3485.
19. Wei, X.-N., et al., *Facile assembly of CdS-reduced graphene oxide heterojunction with enhanced elimination performance for organic pollutants in wastewater*. Applied Surface Science, 2019. **469**: p. 666-673.
20. Devarahosahalli Veeranna, K., M. Theeta Lakshamaiah, and R. Thimmasandra Narayan, *Photocatalytic Degradation of Indigo Carmine Dye Using Calcium Oxide*. International Journal of Photochemistry, 2014. **2014**: p. 1-6.
21. Xu, Y., et al., *Dual-functional polyethersulfone composite nanofibrous membranes with synergistic adsorption and photocatalytic degradation for organic dyes*. Composites Science and Technology, 2020. **199**: p. 108353.
22. Amar, I.A., et al., *Photocatalytic degradation of malachite green dye under UV light irradiation using calcium-doped ceria nanoparticles*. Asian Journal of Nanosciences and Materials, 2020. **3**(1): p. 1-14.
23. Shoukat, R., S.J. Khan, and Y. Jamal, *Hybrid anaerobic-aerobic biological treatment for real textile wastewater*. Journal of Water Process Engineering, 2019. **29**: p. 100804.
24. Khan, R., P. Bhawana, and M. Fulekar, *Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review*. Reviews in environmental science and bio/technology, 2013. **12**(1): p. 75-97.

Références bibliographiques

25. Wang, Y., et al., *Resuscitation, isolation and immobilization of bacterial species for efficient textile wastewater treatment: a critical review and update*. Science of the Total Environment, 2020. **730**: p. 139034.
26. Zdarta, J., et al., *Multi-faceted strategy based on enzyme immobilization with reactant adsorption and membrane technology for biocatalytic removal of pollutants: A critical review*. Biotechnology advances, 2019. **37**(7): p. 107401.
27. Adams, M., et al., *The effect of carrier addition on Anammox start-up and microbial community: a review*. Reviews in environmental science and bio/technology, 2020. **19**(2): p. 355-368.
28. Zhang, M., J. Gu, and Y. Liu, *Engineering feasibility, economic viability and environmental sustainability of energy recovery from nitrous oxide in biological wastewater treatment plant*. Bioresource Technology, 2019. **282**: p. 514-519.
29. Wang, Y., et al., *Resuscitation, isolation and immobilization of bacterial species for efficient textile wastewater treatment: a critical review and update*. Science of the Total Environment, 2020: p. 139034.
30. Zhang, Q., et al., *Fructose as an additional co-metabolite promotes refractory dye degradation: Performance and mechanism*. Bioresource Technology, 2019. **280**: p. 430-440.
31. Khan, Z., et al., *Microaerophilic degradation of sulphonated azo dye–Reactive Red 195 by bacterial consortium AR1 through co-metabolism*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. **94**: p. 167-175.
32. Sbai, G., K. Oukili, and M. Loukili, *Etude de la dégradation des colorants de textile application sur le Bleu de Méthylène [Study of the degradation of the colouring agents of textile application on the Methylene blue]*. International Journal of Innovation and Applied Studies, 2016. **16**(2): p. 272.
33. Mansour, H.B., et al., *Les colorants textiles sources de contamination de l'eau : CRIBLAGE de la toxicité et des méthodes de traitement*. Revue des sciences de l'eau, 2011. **24**(3): p. 209.
34. Gardea-Torresdey, J., et al., *Ability of immobilized cyanobacteria to remove metal ions from solution and demonstration of the presence of metallothionein genes in various strains*. Journal of Hazardous substance research, 1998. **1**(1): p. 2.
35. Wang, C.C., et al., *Biodegradation of 2, 4, 6-trichlorophenol in the presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria*. Chemosphere, 2000. **41**(12): p. 1873-1879.

Références bibliographiques

36. Chen, K., J. Chen, and J. Houn, *Improvement of nitrogen-removal efficiency using immobilized microorganisms with oxidation–reduction potential monitoring*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000. **25**(5): p. 229-234.
37. Chibata, I., Tosa. T. Use of immobilized cells. Annu. Rev. Biophys. Bioeng, 1981. **10**: p. 197-216.
38. Khan, R. and U.C. Banerjee, *Decolorization of azo dyes by immobilized bacteria*, in *Biodegradation of azo dyes* 2010, Springer. p. 73-84.
39. Samsami, S., et al., *Recent advances in the treatment of dye-containing wastewater from textile industries: Overview and perspectives*. Process safety and environmental protection, 2020.
40. Hyde, F., G. Hunt, and L. Errede, *Immobilization of bacteria and Saccharomyces cerevisiae in poly (tetrafluoroethylene) membranes*. Applied and environmental microbiology, 1991. **57**(1): p. 219-222.
41. Zeroual, Y., A. Moutaouakkil, and M. Blaghen, *Volatilization of mercury by immobilized bacteria (Klebsiella pneumoniae) in different support by using fluidized bed bioreactor*. Current Microbiology, 2001. **43**(5): p. 322-327.
42. Isaka, K., et al., *Nitrification of landfill leachate using immobilized nitrifying bacteria at low temperatures*. Biochemical Engineering Journal, 2007. **37**(1): p. 49-55.
43. Monsan, P., *Les methodes immobilisation enzymes*. Les enzymes, productions utilisations industrielles. Gauthier-Villards, Paris, 1982: p. 81-118.
44. Fang, H., H. Wenrong, and L. Yuezhong, *Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4BS*. Water research, 2004. **38**(16): p. 3596-3604.
45. Kudlich, M., et al., *Simultaneous anaerobic and aerobic degradation of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by immobilized cells from a naphthalenesulfonate-degrading mixed culture*. Applied microbiology and biotechnology, 1996. **46**(5): p. 597-603.
46. Zille, A., et al., *Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent*. Biotechnology Letters, 2003. **25**(17): p. 1473-1477.
47. Idaka, E., et al., *Isolation and identification of an azo assimilating bacterium Il Pseudomonas pseudomallei 13NA*. Res Rept Fac Eng Gifu Univ, 1979. **29**: p. 68-70.
48. Ben, A.B., et al., *Physicochemical Characteristics, Identification of Fungi and Optimization of Different Parameters for Degradation of Dye from Tannery Effluent*.

Références bibliographiques

- Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 2020. **24**(7): p. 1203-1208.
49. Bankole, P.O., A.A. Adekunle, and S.P. Govindwar, *Enhanced decolorization and biodegradation of acid red 88 dye by newly isolated fungus, Achaetomium strumarium*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018. **6**(2): p. 1589-1600.
 50. Dayi, B., A.D. Kyzy, and H.A. Akdogan, *Characterization of recuperating talent of white-rot fungi cells to dye-contaminated soil/water*. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2019. **27**(3): p. 634-638.
 51. Gupta, V., *Application of low-cost adsorbents for dye removal—a review*. Journal of environmental management, 2009. **90**(8): p. 2313-2342.
 52. Ahmad, A., et al., *Recent advances in new generation dye removal technologies: novel search for approaches to reprocess wastewater*. RSC advances, 2015. **5**(39): p. 30801-30818.
 53. Kumar, R., J. Rashid, and M. Barakat, *Synthesis and characterization of a starch–ALOOH–FeS 2 nanocomposite for the adsorption of congo red dye from aqueous solution*. RSC advances, 2014. **4**(72): p. 38334-38340.
 54. Georgiou, D., J. Hatiras, and A. Aivasidis, *Microbial immobilization in a two-stage fixed-bed-reactor pilot plant for on-site anaerobic decolorization of textile wastewater*. Enzyme and Microbial Technology, 2005. **37**(6): p. 597-605.
 55. Senan, R.C., et al., *Aerobic Degradation of a Mixture of Azo Dyes in a Packed Bed Reactor Having Bacteria-Coated Laterite Pebbles*. Biotechnology progress, 2003. **19**(2): p. 647-651.
 56. Binkley, J. and A. Kandelbauer, *Effluent treatment-enzymes in activated sludge*. Textile processing with enzymes. Woodhead, Cambridge UK, 2003: p. 199-221.
 57. Dos Santos, A.B., F.J. Cervantes, and J.B. Van Lier, *Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology*. Bioresource Technology, 2007. **98**(12): p. 2369-2385.
 58. Saratale, R.G., et al., *Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2011. **42**(1): p. 138-157.
 59. Metcalf, L., *Wastewater engineering: treatment and reuse*. Metcalf & Eddy Inc, 2003, McGraw-Hill Inc., New York.

Références bibliographiques

60. Alaton, I.A., A. Kornmüller, and M.R. Jekel, *Ozonation of Spent Reactive Dye-Baths: Effect of HCO₃⁻/CO₃²⁻-Alkalinity*. Journal of Environmental Engineering, 2002. **128**(8): p. 689-696.
61. Anjaneyulu, Y., N.S. Chary, and D.S.S. Raj, *Decolourization of industrial effluents—available methods and emerging technologies—a review*. Reviews in environmental science and bio/technology, 2005. **4**(4): p. 245-273.
62. Vandevivere, P.C., R. Bianchi, and W. Verstraete, *Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology, 1998. **72**(4): p. 289-302.
63. Forgacs, E., T. Cserhati, and G. Oros, *Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review*. Environment international, 2004. **30**(7): p. 953-971.
64. Wang, Y., W. Du, and Y. Xu, *Effect of sintering temperature on the photocatalytic activities and stabilities of hematite and silica-dispersed hematite particles for organic degradation in aqueous suspensions*. Langmuir, 2009. **25**(5): p. 2895-2899.
65. Raghu, S., et al., *Evaluation of electrochemical oxidation techniques for degradation of dye effluents—A comparative approach*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **171**(1-3): p. 748-754.
66. Varjani, S.J., et al., *Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015. **103**: p. 116-124.
67. Varjani, S., et al., *Microbial degradation of dyes: An overview*. Bioresource Technology, 2020: p. 123728.
68. Bhatia, D., et al., *Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2017. **47**(19): p. 1836-1876.
69. Kumar, A., et al., *Genetically engineered bacteria for the degradation of dye and other organic compounds*, in *Abatement of Environmental Pollutants 2020*, Elsevier. p. 331-350.
70. Contreras, M., et al., *Bio-removal of methylene blue from aqueous solution by Galactomyces geotrichum KL20A*. Water, 2019. **11**(2): p. 282.
71. Saratale, R.G., et al., *Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2011. **42**(1): p. 138-157.

Références bibliographiques

72. Maas, A.S.V.D., et al., *The degradation of methylene blue dye by the strains of Pleurotus sp. with potential applications in bioremediation processes*. Revista Ambiente & Água, 2018. **13**(4).
73. Mahmoud, M.S., et al., *Bioremediation of red azo dye from aqueous solutions by Aspergillus niger strain isolated from textile wastewater*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2017. **5**(1): p. 547-554.
74. Mostafa, A.A.-F., et al., *Decolorization and biotransformation pathway of textile dye by Cyldrocephalum aurelium*. Bioprocess and biosystems engineering, 2019. **42**(9): p. 1483-1494.
75. Šafaříková, M., et al., *Biosorption of water-soluble dyes on magnetically modified Saccharomyces cerevisiae subsp. uvarum cells*. Chemosphere, 2005. **59**(6): p. 831-835.
76. Jafari, N., M.R. Soudi, and R. Kasra-Kermanshahi, *Biodegradation perspectives of azo dyes by yeasts*. Microbiology, 2014. **83**(5): p. 484-497.
77. Martorell, M.M., et al., *Optimization and mechanisms for biodecoloration of a mixture of dyes by Trichosporon akiyoshidainum HP 2023*. Environmental technology, 2018. **39**(24): p. 3169-3180.
78. Samei, M., M.-H. Sarrafzadeh, and M.A. Faramarzi, *The impact of morphology and size of zinc oxide nanoparticles on its toxicity to the freshwater microalga, Raphidocelis subcapitata*. Environmental Science and Pollution Research, 2019. **26**(3): p. 2409-2420.
79. Pandya, K.Y., et al., *Preliminary study on potential of seaweeds in decolorization efficacy of synthetic dyes effluent*. Int. J. Plant, Animal and Environ Sci, 2017. **7**: p. 59-69.
80. Pandya, K.Y., *Biodecolorization and Biodegradati alvarezii and optimizatio*. Research Journal of Recent, 2017. **6**(6): p. 1-5.
81. Hanifzadeh, M., et al., *Technical, economic and energy assessment of an alternative strategy for mass production of biomass and lipid from microalgae*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018. **6**(1): p. 866-873.
82. Elgarahy, A.M., et al., *Microwave-accelerated sorption of cationic dyes onto green marine algal biomass*. Environmental Science and Pollution Research, 2019. **26**(22): p. 22704-22722.

Références bibliographiques

83. Robledo-Padilla, F., et al., *Evaluation and Predictive Modeling of Removal Condition for Bioadsorption of Indigo Blue Dye by Spirulina platensis*. *Microorganisms*, 2020. **8**(1): p. 82.
84. Kilany, M., *Isolation, screening and molecular identification of novel bacterial strain removing methylene blue from water solutions*. *Applied Water Science*, 2017. **7**(7): p. 4091-4098.
85. Mishra, S. and A. Maiti, *The efficacy of bacterial species to decolourise reactive azo, anthroquinone and triphenylmethane dyes from wastewater: a review*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018. **25**(9): p. 8286-8314.
86. Barathi, S., et al., *Biodegradation of textile dye Reactive Blue 160 by Bacillus firmus (Bacillaceae: Bacillales) and non-target toxicity screening of their degraded products*. *Toxicology reports*, 2020. **7**: p. 16-22.
87. Khehra, M.S., et al., *Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes*. *Water Research*, 2005. **39**(20): p. 5135-5141.
88. Upendar, G., et al., *Bioremediation of methylene blue dye using Bacillus subtilis MTCC 441*. *Water Science and Technology*, 2017. **75**(7): p. 1572-1583.
89. Rahman, R.N.Z.A., et al., *Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells*. *Journal of Microbiology*, 2006. **44**(3): p. 354-359.
90. Chang, Y.C. and C.C. Chou, *Growth and production of cholesterol oxidase by alginate-immobilized cells of Rhodococcus equi No. 23*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2002. **35**(2): p. 69-74.
91. Khehra, M.S., et al., *Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium*. *Dyes and Pigments*, 2005. **67**(1): p. 55-61.
92. Joshi, T., et al., *Isolation, identification and application of novel bacterial consortium TJ-1 for the decolourization of structurally different azo dyes*. *Bioresource Technology*, 2008. **99**(15): p. 7115-7121.
93. Ohta, T., et al., *Development of a fermentation method using immobilized cells under unsterile conditions. 2. Ethanol and L-lactic acid production without heat and filter sterilization*. *Applied microbiology and biotechnology*, 1994. **42**(2): p. 246-250.
94. Erkurt, H.A., *Biodegradation of azo dyes* 2010: Springer.
95. Zhou, Y., et al., *Recent advances for dyes removal using novel adsorbents: a review*. *Environmental pollution*, 2019. **252**: p. 352-365.

Références bibliographiques

96. Bai, N., et al., *Degradation of nonylphenol polyethoxylates by functionalized Fe₃O₄ nanoparticle-immobilized Sphingomonas sp. Y2*. Science of the Total Environment, 2018. **615**: p. 462-468.
97. Ke, Q., et al., *Sustainable biodegradation of phenol by immobilized Bacillus sp. SAS19 with porous carbonaceous gels as carriers*. Journal of environmental management, 2018. **222**: p. 185-189.
98. Rodrigues, R.C., et al., *Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions*. Biotechnology advances, 2019. **37**(5): p. 746-770.
99. Liu, J., et al., *Enhanced degradation of prometryn and other s-triazine herbicides in pure cultures and wastewater by polyvinyl alcohol-sodium alginate immobilized Leucobacter sp. JW-1*. Science of the Total Environment, 2018. **615**: p. 78-86.
100. Kurade, M.B., et al., *Decolorization of textile industry effluent using immobilized consortium cells in upflow fixed bed reactor*. Journal of Cleaner Production, 2019. **213**: p. 884-891.
101. Hsu, C., et al., *Effects of surface characteristics and xanthan polymers on the immobilization of Xanthomonas campestris to fibrous matrices*. Journal of food science, 2004. **69**(9): p. E441-E448.
102. Kumar, G., et al., *Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production*. Bioresource Technology, 2016. **219**: p. 725-737.
103. San, N.O., et al., *Reusable bacteria immobilized electrospun nanofibrous webs for decolorization of methylene blue dye in wastewater treatment*. RSC Adv., 2014. **4**(61): p. 32249-32255.
104. Sharma, D., et al., *Biological treatment of textile dye Acid violet-17 by bacterial consortium in an up-flow immobilized cell bioreactor*. Letters in applied microbiology, 2004. **38**(5): p. 345-350.
105. Tuttolomondo, M.V., et al., *Removal of azo dyes from water by sol-gel immobilized Pseudomonas sp.* Journal of Environmental Chemical Engineering, 2014. **2**(1): p. 131-136.
106. Cai, J., et al., *Effective decolorization of anthraquinone dye reactive blue 19 using immobilized Bacillus sp. JF4 isolated by resuscitation-promoting factor strategy*. Water Science and Technology, 2020. **81**(6): p. 1159-1169.

Références bibliographiques

107. Reddy, S. and J.W. Osborne, *Biodegradation and biosorption of Reactive Red 120 dye by immobilized Pseudomonas guariconensis: Kinetic and toxicity study*. Water Environment Research, 2020. **92**(8): p. 1230-1241.
108. Desbordes, D., *Qualité microbiologique des fruits et légumes: flores, altérations, risques sanitaires, prévention*. Rapport de Recherche Bibliographique, 2003: p. 20-23.
109. Ninfali, P. and D. Angelino, *Nutritional and functional potential of Beta vulgaris cicla and rubra*. Fitoterapia, 2013. **89**: p. 188-199.
110. Schwartz, S.J. and J.H. Von Elbe, *Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1980. **28**(3): p. 540-543.
111. Kanner, J., S. Harel, and R. Granit, *Betalains a new class of dietary cationized antioxidants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(11): p. 5178-5185.
112. Lee, E.J., et al., *Betalain and betaine composition of greenhouse-or field-produced beetroot (Beta vulgaris L.) and inhibition of HepG2 cell proliferation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(6): p. 1324-1331.
113. Klewicka, E. and A. Czyzowska, *Biological stability of lactofermented beetroot juice during refrigerated storage*. Polish journal of food and nutrition sciences, 2011. **61**(4).
114. Esatbeyoglu, T., et al., *Betanin—A food colorant with biological activity*. Molecular nutrition & food research, 2015. **59**(1): p. 36-47.
115. Sokolowska, B., et al., *Evaluation of microbial contamination of commercially available unpasteurized, freshly squeezed fruit and vegetable juices*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2011. **569**: p. 219-228.
116. Sokołowska, B. and J. Nasiłowska, *Controlling spoilage and pathogenic microorganisms in beetroot (Beta vulgaris) juice by high hydrostatic pressure*, in *Safety Issues in Beverage Production*2020, Elsevier. p. 79-104.
117. Patel, A., et al., *Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products*. Food Bioscience, 2014. **5**: p. 27-33.
118. Kręgiel, D., et al., *Zanieczyszczenia mikrobiologiczne surowców*, in (w:) *Mikrobiologia techniczna: Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności*2008, PWN. p. 235-252.
119. Szczech, M. and B. Kowalska, *Mikroflora warzyw ekologicznych*. Nowości Warzywnicze, 2010. **51**: p. 65-72.

Références bibliographiques

120. Walkowiak-Tomczak, D. and A. Zielińska, *Effect of fermentation conditions on red-beet leaven quality*. Polish journal of food and nutrition sciences, 2006. **15**(4): p. 437-444.
121. Ahmad, I. and F. Aqil, *New strategies combating bacterial infection* 2008: John Wiley & Sons.
122. Pavan, F.A., A.C. Mazzocato, and Y. Gushikem, *Removal of methylene blue dye from aqueous solutions by adsorption using yellow passion fruit peel as adsorbent*. Bioresource Technology, 2008. **99**(8): p. 3162-3165.
123. Hecht, H. and S. Srebnik, *Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate*. Biomacromolecules, 2016. **17**(6): p. 2160-2167.
124. Pochon, J. and P. Tardieux, *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Vol. 11. 1962: Editions de la Tourelle.
125. Brown, A.E., *Microbiological Applications*. McGRAW-Hill Companies, 2005. **35**: p. 217-224.
126. Moussaoui, W., C. Bouakaze, and G. Prevost, *Applications de la spectrographie de masse MALDI TOF à l'identification bactérienne*. Bull Soc Fr Microbiol, 2009. **24**: p. 293-302.
127. Michaelis, L. and M.L. Menten, *Die kinetik der invertinwirkung*. Biochem. z, 1913. **49**(333-369): p. 352.
128. Wanyonyi, W.C., et al., *Biodegradation and detoxification of malachite green dye using novel enzymes from bacillus cereus strain KM201428: kinetic and metabolite analysis*. Energy Procedia, 2017. **119**: p. 38-51.
129. Chuma, P., *Biosorption of Cr, Mn, Fe, Ni, Cu and Pb metals from petroleum refinery effluent by calcium alginate immobilized mycelia of Polyporus squamosus*. Scientific Research and Essays, 2007. **2**(7): p. 217-221.
130. Rosas, S.B., *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca SR1: isolated from rhizosphere and its return as inoculant. A review*. International Biology Review, 2017. **1**(3).
131. Bodelier, P.L. and H.J. Laanbroek, *Oxygen uptake kinetics of Pseudomonas chlororaphis grown in glucose-or glutamate-limited continuous cultures*. Archives of microbiology, 1997. **167**(6): p. 392-395.
132. Legard, D., et al., *Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically modified microorganism*. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1994. **50**(2): p. 87-101.

Références bibliographiques

133. Doughari, H.J., et al., *The ecology, biology and pathogenesis of Acinetobacter spp.: an overview*. Microbes and environments, 2009: p. 1103150282-1103150282.
134. Kozińska, A., et al., *Acinetobacter johnsonii and Acinetobacter lwoffii-the emerging fish pathogens*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2014. **58**(2): p. 193-199.
135. Guinebretière, M.-H., et al., *Ability of Bacillus cereus group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation*. Journal of clinical microbiology, 2010. **48**(9): p. 3388-3391.
136. Guinebretière, M.-H., et al., *Bacillus cytotoxicus sp. nov. is a novel thermotolerant species of the Bacillus cereus group occasionally associated with food poisoning*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2013. **63**(Pt_1): p. 31-40.
137. Thorsen, L., et al., *Characterization of emetic Bacillus weihenstephanensis, a new cereulide-producing bacterium*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(7): p. 5118-5121.
138. P Shah, M., *Microbial degradation of Textile Dye (Remazol Black B) by Bacillus spp. ETL-2012*. Journal of Bioremediation & Biodegradation, 2012. **04**(02).
139. Bandary, B., Z. Hussain, and R. Kumar, *Effect of carbon and nitrogen sources on Escherichia coli bacteria in removing dyes*. Materials Today: Proceedings, 2016. **3**(10): p. 4023-4028.
140. BANDARY, B., Z. HUSSAIN, and P. KING, *Experimental study on non sporulating escherichia coli bacteria in removing methylene blue*. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2016. **7**((1): (B)): p. 629 - 637.
141. Tripathi, A. and S. K. Srivastava, *Ecofriendly Treatment of Azo Dyes: Biodecolorization using Bacterial Strains*. Vol. 1. 2011. 37-40.
142. Saratale, R.G., et al., *Decolorization and biodegradation of reactive dyes and dye wastewater by a developed bacterial consortium*. Biodegradation, 2010. **21**(6): p. 999-1015.
143. Chen, K.-C., et al., *Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains*. Journal of Biotechnology, 2003. **101**(1): p. 57-68.
144. Guo, J., et al., *Biocalalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salt-tolerant bacteria*. Water research, 2007. **41**(2): p. 426-432.

Références bibliographiques

145. Saratale, R., et al., *Decolorization and biodegradation of textile dye Navy blue HER by Trichosporon beigeli NCIM-3326*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **166**(2-3): p. 1421-1428.
146. Sudha, M., et al., *Prospective assessment of the Enterobacter aerogenes PP002 in decolorization and degradation of azo dyes DB 71 and DG 28*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018. **6**(1): p. 95-109.
147. Ayed, L., et al., *Biodegradation and decolorization of triphenylmethane dyes by Staphylococcus epidermidis*. Desalination, 2010. **260**(1): p. 137-146.
148. Habibi, A. and Z. Mehrabi, *Aerobic degradation of methylene blue from colored effluents by Ralstonia eutropha*. 2017.
149. Karatay, S.E., N.K. Kılıç, and G. Dönmez, *Removal of Remazol Blue by azoreductase from newly isolated bacteria*. Ecological Engineering, 2015. **84**: p. 301-304.
150. Lavanya, C., et al., *Degradation of toxic dyes: A review*. Vol. 3. 2014. 189-199.
151. Shah, M.P., *Microbial degradation of textile dye (Remazol Black B) by Bacillus spp. ETL-2012*. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2013. **1**(1): p. 6-11.
152. Pushpa, V. and K. Yogendra, *Effect of Carbon and Nitrogen Sources for the Degradation of Red 2G by Bacillus Sp*. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res, 2017. **47**(1): p. 108-113.
153. Shah, P.D., S.R. Dave, and M. Rao, *Enzymatic degradation of textile dye Reactive Orange 13 by newly isolated bacterial strain Alcaligenes faecalis PMS-1*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012. **69**: p. 41-50.
154. Al-Fawwaz, A.T. and M. Abdullah, *Decolorization of Methylene Blue and Malachite Green by Immobilized Desmodesmus sp. Isolated from North Jordan*. International Journal of Environmental Science and Development, 2016. **7**(2): p. 95-99.

