



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques de Fès

www.fst-usmba.ac.ma

Année Universitaire : 2017-2018

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Bioremédiation du rouge de carmoisine par des souches de levures : mécanismes et modélisation

Présenté par : AGZOUR Khadija

Encadré par : Pr. EL GHACHTOULI Naïma

Pr. BAHAFID Wifak

Soutenu le : 12 juin 2018

Devant le jury composé de :

Pr. HAGGOURD Abdellatif

FST Fès

Pr. BAHAFID Wifak

FST Fès

Pr. EL GHACHTOULI Naïma

FST Fès

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

☒ B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14

Dédicace

A mes très chers parents, aucun mot ne saurait exprimer à sa juste valeur le dévouement et le profond respect que je porte envers vous. Rien au monde ne pourrait compenser tout ce que vous avez fait pour moi. Que ce travail soit le témoignage de ma gratitude et de mon grand amour. Que DIEU vous accorde santé, bonheur et prospérité.

Une dédicace spéciale, à une personne qui m'a beaucoup soutenu, mon mari

A ma sœur et mes frères

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

A toute ma famille et mes amies

A tous ceux qui me sont chers

Remerciement

Louange à DIEU tout puissant de m'avoir donné la volonté, le courage et la patience pour la réalisation de ce travail.

Cette étude a été réalisée dans le laboratoire de biotechnologie microbienne à la faculté de sciences et techniques Fès, je tiens à remercier son directeur, Pr. IBNSOUDA KORAICHI Saad.

J'adresse ma profonde gratitude à mes deux encadrante Pr. Naïma EL GHACHTOULI & Pr. Wifak BAHAFID, pour avoir suivi ce travail, leur aide inestimable, leur compétence, leur disponibilité, leurs critiques constructives et leur rigueur scientifique qui m'ont été très utiles, et leurs conseils qui m'ont permis de conduire ce travail jusqu'à son terme.

Je tiens à témoigner ici ma respectueuse reconnaissance à Mr Abdellatif HAGGOURD, Professeur à la faculté des sciences et techniques Fès, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je saisi l'occasion pour remercier Pr. Mohammed IRAQI HOUSAINI, chef de filière de la biotechnologie microbienne, qui ne ménage aucun effort pour la réussite de notre formation.

Je ne saurais également oublier de remercier toute l'équipe de laboratoire de biotechnologie microbienne pour l'ambiance chaleureuse et amicale qui nous a été garantis. Je saisi l'occasion pour remercier particulièrement le doctorant chercheur Mr. Mohammed DANOUCHE pour l'intérêt porté à ce travail et les conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Merci à tout ce qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation et la réussite de ce travail

RÉSUMÉ

Les activités industrielles génèrent des effluents riches en molécules organiques récalcitrantes aux techniques de traitement classiques, telles que les colorants azoïques. L'objectif de ce travail est la contribution à la mise en place de procédé de traitement biologique des effluents colorés et l'étude des mécanismes impliquées dans ce processus.

Les souches de levure M1 et M3 utilisées dans ce travail, se sont avérées capables d'éliminer différents colorants azoïques, y compris le rouge de carmoisine (RC). Ce dernier (50 mg/L) a été décoloré à 95,37 % et 96,05 %, respectivement par M1 et M3, à 30°C sous agitation. La décoloration du RC a été confirmée par la disparition de la bande d'adsorption maximale du RC située à 515 nm, montrée par analyse par la spectroscopie UV-Vis. L'analyse de l'activité enzymatique laccase des cellules de levure a montré une augmentation de cette activité suite à l'ajout de 25 mg/L du RC dans le milieu de culture, suggérant l'implication de cette enzyme dans le processus de dégradation du RC.

Les cellules mortes de levures ont été capables d'éliminer 30 % et 40 % du RC, respectivement pour M1 et M3. Des modèles cinétiques et isothermes ont été créés pour évaluer les mécanismes de biosorption par ces cellules. La biosorption a suivi le modèle de Langmuir et la cinétique de deuxième ordre pour les deux souches. La spectroscopie infrarouge à transfert de Fourier (FT-IR) a été utilisée pour caractériser et identifier les sites de liaison possibles, ce qui a confirmé l'implication des groupes hydroxyles, carboxyles, amines et phosphates.

Le criblage des facteurs influents la biosorption, par la matrice de Plackett-Burmand, a montré la forte contribution du pH suivi par la concentration du RC et la biomasse.

L'essai de toxicité a montré que l'utilisation des levures a entraîné une diminution significative de la toxicité de la solution de colorant vis-à-vis des graines de *Medicago sativa*.

Mot clé : Bioremédiation, Levure, Rouge de carmoisine, Biodégradation, Biosorption, phytotoxicité

ABSTRACT

Industrial activities generate effluents rich in recalcitrant organic molecules to conventional treatment techniques, such as azo dyes. The objective of this work is the contribution to the implementation of biological treatment process of colored effluents and the study of the mechanisms involved in this process.

The yeast strains M1 and M3 used in this work have been shown to be able to eliminate various azo dyes, including Acid Red B (ARB). The latter (50 mg / L) was removed and decolorization reached 95.37% and 96.05% respectively by M1 and M3 at 30 ° C. with stirring condition. Discoloration of ARB was confirmed by the disappearance of the maximum adsorption band at 515 nm, shown by UV-Vis spectroscopy analysis. The analysis of the enzyme activity laccase of yeast cells showed an increase of this activity following the addition of 25 mg / L of ARB in the culture medium, suggesting the involvement of this enzyme in the degradation process.

Dead yeast cells were able to remove 30 % and 40 % of the dye, respectively for M1 and M3. Kinetic and isothermal models were created to evaluate the biosorption mechanisms of these cells. Biosorption followed the Langmuir model and second order kinetics for both strains. Fourier transfer infrared (FT-IR) spectroscopy was used to characterize and identify possible binding sites, which confirmed the involvement of hydroxyl, carboxyl, amine and phosphate groups.

Screening of factors influencing biosorption, by the Plackett-Burmand matrix, showed the strong contribution of pH followed by the concentration of ARB and biomass.

The toxicity test showed that the use of yeasts resulted in a significant decrease in the toxicity of the dye solution to *Medicago sativa* seeds.

Keyword: Bioremediation, Yeast, Acid Red B, Biodegradation, Biosorption, phytotoxicity

TABLE DES MATIÈRES

Dédicace.....	i
Remerciement.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. Problématique de la pollution des eaux par les colorants.....	5
2. Classification des colorants.....	5
2.1. Colorants naturels.....	5
2.2. Colorants synthétiques.....	5
2.2.1. Colorants azoïques.....	6
2.2.2. Cas du rouge de carmoisine.....	6
3. Toxicité des colorants et leur impact sur l'environnement.....	7
3.1. Effet sur la santé.....	7
3.2. Effet sur l'environnement.....	8
3.3. Législation sur le rejet des colorants dans l'environnement.....	8
4. Méthodes de traitement des colorants.....	9
4.1. Méthodes physico-chimiques.....	9
4.2. Méthodes biologiques.....	9
4.2.1. Phytoremédiation.....	10
4.2.2. Bioremédiation.....	10
5. Mécanisme d'élimination des colorants azoïques.....	13
5.1. Biosorption.....	14
5.2. Biodégradation.....	15
5.2.1. Dégradation des colorants azoïques par des enzymes réductives.....	15
5.2.2. Dégradation des colorants par des enzymes oxydatives.....	15
PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	16
1. Microorganismes et conditions de culture.....	17
1.1. Microorganismes.....	17
1.2. Milieux de culture.....	17
1.3. Préparation de l'inoculum.....	17

1.4.	Colorants utilisés	17
2.	Etude de la décoloration	18
2.1.	Mise en évidence de la capacité de décoloration de différents colorants azoïques par les cellules de levures	18
2.2.	Etude de la cinétique de la décoloration du RC.....	19
2.3.	Effet de l'immobilisation des cellules sur la décoloration.....	19
3.	Etude des mécanismes de la décoloration du RC	20
3.1.	Etude de la biodégradation.....	20
3.1.1.	Extraction des produits de dégradation	20
3.1.2.	Caractérisation des produits de dégradation.....	20
3.1.3.	Mesure de l'activité enzymatique de la laccase.....	21
3.2.	Etude de la biosorption	22
3.2.1.	Effet de l'inactivation des cellules sur la décoloration	22
3.2.2.	Modélisation des isothermes d'adsorption	22
3.2.3.	Etude de la cinétique d'adsorption	24
3.2.4.	Analyse et caractérisation de l'adsorbant (cellules de levures)	25
3.2.5.	Criblage des facteurs influents la biosorption	26
4.	Evaluation de la toxicité des produits de dégradation	29
4.1.	Protocole.....	29
4.2.	Analyse statistique.....	29
	PARTIE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	30
1.	Décoloration des colorants azoïques par les souches de levures.....	31
1.1.	Mise en évidence de la capacité de décoloration des souches	31
1.2.	Cinétique de la croissance et de la décoloration du RC par les cellules de levures	33
2.	Etude du mécanisme de la décoloration	36
2.1.	Etude de la biodégradation.....	36
2.1.1.	Analyse de la décoloration par la spectroscopie UV-visible	36
2.2.	Analyse des produits de dégradation.....	37
2.2.1.	Chromatographie sur couche mince (CCM).....	38
2.3.	Mesure de l'activité enzymatique laccase.....	38
3.	Etude de le biosorption	40
3.1.	Décoloration du RC par les cellules mortes	40
3.2.	Caractérisation de l'adsorbant par IRTF	41
3.3.	Adsorption du RC à différentes concentrations par M1 et M3.....	45

3.4. Modèles isothermes d'adsorption	47
3.5. Etude cinétique	51
3.6. Diffusion intraparticulaire	54
3.7. Criblage des facteurs influençant la biosorption	56
3.7.1. Résultats expérimentaux	56
3.7.2. Etude des effets des facteurs	56
3.7.3. Analyse et interprétation des résultats	57
4. Test de phytotoxicité	58
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	61
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-ABA	L'acide 2-aminobenzoïque
CCM	Chromatographie sur couche mince
CI	Colour index
DBO ₅	Demande Biochimique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
DO	Densité optique
DMPD	N, N-diméthylphénylènediamine
IRTF	Spectroscopie Infra-Rouge à Transformé de Fourier
mg	Milligramme
mL	Millilitre
NADH/ NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide (réduit, oxydé).
nm	Nanomètre
pH	Potentiel Hydrogène
PIB	Produit intérieur brut
RC	Rouge de carmoisine
rpm	Rotation par minute
GC/MS	Chromatographie gazeuse couplée à spectrométrie de masse
RC	Rouge de carmoisine
Rf	Rapport frontal
RM	Rouge de méthyle
UV/vis	Ultra-violet / visible
YPG	Yeast Peptone Glucose

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Pourcentage de décoloration de de cinq colorants azoïques (50 mg/L) par les souches de levures M1 et M3 après 24h à 30°C et 150 rpm.....	31
Figure 2: Cinétique de la croissance et de la décoloration du RC (50 mg/L) par les souches M1 et M3	33
Figure 3: % Décoloration du RC (25mg/L) par les cellules des levures M1 et M3 immobilisées sur l'alginate de sodium et sur le CMC, à 30°C et 150rpm	35
Figure 4 : Spectre de l'UV-vis du RC (50 mg/L) et ses produits de dégradation par M1 et M3 (24h, 150 rpm, 30°C).....	36
Figure 5 : résultats de la CCM obtenus pour les produits de la décoloration par M1 et M3 visualisés sous rayonnement UV (Gauche) ou sans UV (Droite)	38
Figure 6 : Décoloration du RC (50 mg/L) par les cellules de M1 et M3 vivantes (v) ou mortes (m) à 30°C et 150 rpm.....	40
Figure 7: Spectre IRTF des cellules de levures M1 et M3 : vivantes (v), mortes (m) et mortes additionnées de RC (25 mg/L)	42
Figure 8 : Etude de l'équilibre de l'adsorption du RC en fonction du temps par les levures M1 et M3	46
Figure 9: Isothermes d'adsorption de Langmuir du RC par les souches M1 et M3 (2g/L)	48
Figure 10: Isothermes d'adsorption de Freundlich du RC par les souches M1 et M3 (2g/L)..	49
Figure 11 : Modèle de la cinétique « pseudo-premier ordre » appliqué à l'adsorption du RC par les cellules de levure M1 et M3	51
Figure 12 : Modèle de la cinétique « pseudo-second-ordre » appliqué à l'adsorption du RC par les levures M1 et M3	52
Figure 13 : Représentation de la diffusion intraparticulaire pour l'adsorption du RC par les souches M1 et M3	54
Figure 14 : Les effets Pareto des coefficients de la réponse Y(M3)	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1- Caractéristiques du rouge de carmoisine (Amin et al., 2010)	7
Tableau 2- Quelques études concernant le traitement des colorants azoïques par les bactéries	12
Tableau 3- quelques études concernant le traitement des colorants azoïques par des levures.	13
Tableau 4- Caractéristiques des colorants azoïques testés	18
Tableau 5- Valeurs expérimentales et niveaux correspondants pour les facteurs testés (Xi) ..	27
Tableau 6- matrice de planification des expériences à 5 facteurs	28
Tableau 7 -Activité laccase pour les souches M1 et M3, en présence ou en absence de RC (25 mg/L).....	39
Tableau 8 -les pics enregistrés et leur correspondance selon la littérature	43
Tableau 9 - Paramètres et facteurs de corrélation des modèles des isothermes d'adsorption du RC par les souches de levure M1 et M3.....	48
Tableau 10 - Variation de l'intensité d'adsorption (R_L) en fonction de la concentration initiale du RC dans le milieu (C_0 mg. L ⁻¹).....	48
Tableau 11- Comparaison de Q_{max} et K_L de Langmuir entre différents biosorbants	50
Tableau 12- Paramètres cinétique de l'adsorption du RC sur la biomasse de levure M1 et M3	53
Tableau 13 -Paramètres du modèle de la diffusion intraparticulaire	55
Tableau 14- Résultats du plan d'expérimentation.....	56
Tableau 15- Estimation des effets des facteurs du plan de Plackett et Burman (M3).....	57
Tableau 16- Effet des produits de dégradation sur la germination et la croissance de luzerne	59

INTRODUCTION GÉNÉRALE

De nos jours, la protection des écosystèmes est devenue un enjeu majeur. L'augmentation des activités industrielles engendre une pression grandissante sur les réserves en eau douce de la planète. En effet, ces activités génèrent une grande diversité de produits chimiques qui se déversent dans l'eau, mettant en péril l'équilibre naturel qui a permis à la vie de se développer sur la terre.

Etant une des premières industries pourvoyeuses d'emploi, l'industrie de textile contribue à près de la moitié des exportations de l'industrie manufacturière, avec 16% de la production industrielle totale, et plus de 3% dans le PIB, ce secteur joue un rôle très important dans l'économie (Meddeb, 2000).

Toutefois, cette filière est parmi les industries les plus consommatrices de l'eau, générant des effluents en grandes quantités difficilement dégradables, vu l'hétérogénéité de leur composition. Les colorants sont les premiers contaminants à être reconnus par l'œil nu dans ces rejets.

En raison de leur production à grande échelle et de leur application très répandue, les colorants sont à l'origine d'une pollution environnementale considérable et représentent un facteur de risque très sérieux pour la santé publique (McKay, 1979). En effet, le rejet brutal et massif de ces résidus toxiques dans le milieu naturel est une source dramatique de pollution esthétique, d'eutrophisation et de plusieurs perturbations, y compris la diminution de l'activité photosynthétique et de l'oxygène dissous (DO) ainsi que l'altération du pH, l'augmentation de la demande biochimique en oxygène (DBO) et de la demande chimique en oxygène (DCO), dans la vie aquatique (Amin et al., 2010 ; Saratale et al., 2013 ; Sol'is et al., 2012).). Ainsi, l'élimination de ces polluants avant leur rejet dans l'environnement est d'une importance capitale (Ayed et al., 2011).

L'élimination de ces polluants des rejets industriels est très souvent réalisée par des méthodes physico-chimiques classiques tel que : la décantation, coagulation, floculation, oxydation, etc. Toutefois, les eaux résiduaires traitées par ces procédés contiennent encore des polluants et sont chargées en plus de réactifs ajoutés. Dans la plupart des cas, ces procédés sont très onéreux.

Dans l'optique de limiter la présence de ces composés organiques bio-récalcitrants dans les eaux usées et l'environnement, des stratégies de traitement efficaces et écologiques ont été développées. Les procédés innovants qui utilisent le pouvoir des microorganismes sont devenus

de puissants outils qui peuvent souvent concurrencer avantageusement les méthodes physico-chimiques préexistantes pour le traitement des sites pollués.

Dans la littérature, plusieurs microorganismes ont montré la capacité de dégrader les colorants (Saratale et al., 2011). Cependant peu d'études ont porté sur les levures. En effet, les levures sont à la fois douées de grandes capacités de résistance aux conditions défavorables comme les champignons filamenteux, et sont capables de croître assez rapidement comme les bactéries. De ce fait ce sont de microorganismes promoteurs dans le cadre de la bioremédiation.

La présente étude a pour objectif l'étude de la potentialité de deux souches de levures, dans la dépollution de l'eau, particulièrement l'élimination d'un colorant azoïque le rouge de carmoisine (RC). Elle vise principalement d'élucider les mécanismes impliqués dans le processus de décoloration, de valoriser la biomasse issue de ces levures en tant que biosorbant, de caractériser les produits issus de la dégradation du RC et d'évaluer leur toxicité.

Ce travail est structuré en trois parties :

La première partie est consacrée à la réalisation d'une synthèse bibliographique rassemblant : des généralités sur les colorants utilisés dans l'industrie et leur impact sur l'environnement (toxicité engendrée par leur présence dans les eaux des rejets industriels) et les différentes méthodes de traitement des eaux contaminées par les colorants, en particulier les méthodes biologiques.

La deuxième partie présente un descriptif du matériel, des méthodes analytiques et des procédures expérimentales abordées pour réaliser cette étude.

La troisième partie est dédiée à l'interprétation et la discussion des différents résultats obtenus.

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Problématique de la pollution des eaux par les colorants

La menace de la pollution par les colorants a atteint un niveau élevé ces dernières années étant donné qu'ils sont parmi les produits chimiques les plus consommés dans une multitude d'industries. En effet, une grande augmentation a été observée dans l'utilisation de colorants pour des applications telles que les textiles et cuirs, les détergents, les médicaments et les produits cosmétiques (Hou et al., 2017 ; Ooi et al., 2017). On estime que plus de 7×10^5 tonnes de colorants synthétiques sont produites dans le monde entier et que plus de 10 000 colorants et pigments différents sont utilisés industriellement (Sen et al., 2011, Checker et al., 2013).

La Banque mondiale estime que 17 à 20 % de la pollution industrielle de l'eau provient des processus de teinture et du traitement des textiles, ces industries produisent des effluents contenant des composés chimiques potentiellement toxiques et extrêmement récalcitrants (Mansour et al., 2012 ; Kant, 2012 ; Chen et Burns, 2006)

2. Classification des colorants

Comme il existe de nombreux colorants produits dans le monde, il est nécessaire de les enregistrer et de les classer correctement. Il faut essentiellement distinguer entre les colorants naturels et les colorants synthétiques dont l'invention a marqué un tournant technique, scientifique et économique majeur.

2.1. Colorants naturels

Jusqu'au XIXe siècle, les colorants étaient naturels. Ils étaient, pour l'essentiel, d'origine végétale : la garance, les lichens, le noyer, la gaude ou l'indigo, etc... Les colorants peuvent également être d'origine animale telle que la précieuse pourpre impériale provenant du murex et le cramoisi de la cochenille. Ils peuvent également être d'origine minérale en citant l'exemple du bleu outremer obtenu par le broyage de lapis-lazuli.

Malgré la diminution de leur importance économique, les colorants naturels restent, très utilisés dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques avec des réglementations très strictes (Bouyarmane, 2014).

2.2. Colorants synthétiques

Les colorants de synthèse ont progressivement supplanté les colorants naturels. Les recherches, menées depuis le milieu du XIXe siècle, ont débouché sur la fabrication de très nombreuses familles de colorants. Ces derniers sont généralement classés sur la base de leur

dissolution de charge de particules dans un milieu d'application aqueux (Purkait et al., 2005). On distingue alors, les colorants cationiques (tous colorants basiques), anioniques (directs, acides et réactifs), et non ioniques (colorants dispersés). Les colorants synthétiques peuvent également être classés selon leur structure chimique (Classification chimique), ou bien selon leur mode d'utilisation et d'application sur différents substrats (Classification tinctoriale) (Bouyarmane, 2014). Selon la classification chimique on distingue plusieurs sous-classes dont les plus importantes sont représentées par les colorants anthraquinonique et les colorants azoïques (Benaïssa, 2011).

2.2.1. Colorants azoïques

Parmi les colorants synthétiques commerciaux, les colorants azoïques (composés organiques les plus anciens synthétisés industriellement) représentent la plus grande classe avec une large gamme de couleurs et de structures et représentent jusqu'à 70 % du total des colorants textiles utilisés (Lang et al., 2013).

Ceci est grâce à leurs caractéristiques et propriétés physicochimiques attrayantes, telles que : l'application facile, la grande stabilité photolytique, la disponibilité d'une large gamme de nuances brillantes, la forte adhérence covalente aux fibres textiles et la consommation minimale d'énergie (Brüschweiler & Merlot, 2017). Ces colorants appartiennent à la classe des composés aromatiques et hétérocycliques ayant la liaison azoïque ($N = N$) qui sont récalcitrants et possèdent même des propriétés carcinogènes (Saratale et al., 2011). Ils sont obtenus à partir du couplage de sels de diazonium avec des amines aromatiques, des phénols, des naphthols ou des énols aliphatiques.

2.2.2. Cas du rouge de carmoisine

Le rouge de carmoisine, aussi connu sous les noms Azorubine, CI Acid Red B ou Acid Red 14, est un colorant azoïque qui se présente sous forme d'un sel disodique, il est composé de deux cycle de naphthalène liés par un pont $N=N$ (voir la structure ci-dessous). Il est utilisé comme additif alimentaire (confiture, yaourt), en cosmétique (savons liquides, rouge à lèvres, gels douche ...) et dans certains médicaments pour les enfants (Doliprane pédiatrique) (Amin et al., 2010). Le tableau 1 présente quelques caractéristiques moléculaires de ce colorant.

Tableau 1- Caractéristiques du rouge de carmoisine (Amin et al., 2010)

Nom	Azorubine, Acid Red 14, ...
Couleur	Rouge
Masse molaire	502,428 ± 0,029
λ_{max}	515 nm
Formule brute	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂
Nomenclature	4-hydroxy-3-[(4-sulfonatonaphtyl) azo] naphtalène sulfonate de disodium
Classe	Monoazoïque

3. Toxicité des colorants et leur impact sur l'environnement

Des études approfondies ont été entreprises pour expliquer les répercussions à court et à long terme des colorants sur la santé humaine et l'écologie naturelle (Long et al., 2017, Shabbir et al., 2017).

3.1.Effet sur la santé

Des expériences sur des rats albinos suisses en tant qu'organismes modèles ont montré la toxicité des eaux usées textiles pour les animaux (Sharma et al., 2007).

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 (Hoet et al., 1999).

La mutagénicité et la cancérogénicité des colorants azoïques et de leurs dérivés ont déjà été rapportées par Yahagi et al. (1975). Par ailleurs, il a été démontré que le rouge de carmoisine, particulièrement, inhibe l'activité de l'enzyme cholinestérase dans les cellules érythrocytaire

ainsi que dans le plasma (Osman et al., 2004). Il a été également montré que ce colorant provoque de l'asthme, l'éruption cutanée chez beaucoup de gens et stimule certains effets comportementaux comme les crises de colère, l'hyperactivité et l'insomnie chez les enfants (Gupta et al., 2009). Des doses élevées du colorant peuvent également entraîner la somnolence, le coma, et même la mort (Gaunt et al., 1967).

3.2. Effet sur l'environnement

L'impact des colorants sur l'environnement était sujet de plusieurs études, il se manifeste sous différents aspects, notamment l'eutrophisation. En effet, sous l'action des microorganismes, les colorants libèrent des nitrates et des phosphates dans le milieu naturel. La consommation de ces ions minéraux par les algues et les plantes aquatiques accélère leur prolifération anarchique en induisant un phénomène de sous-oxygénation. Par ailleurs, en plus de leur aspect esthétique nuisant, les colorants interfèrent avec la transmission de la lumière dans l'eau en bloquant la photosynthèse.

La bioaccumulation est parmi les dangers à long terme confronté par la présence de ces polluants dans la nature. En effet, les colorants synthétiques, en particulier azoïque, sont des composés persistants dans l'environnement en raison de leurs caractéristiques chimiques (la présence de cycles aromatiques, de substituants halogène, etc.) (Pagga et Brown, 1986).

En outre, Les colorants sont peu disposés au catabolisme oxydatif dans les conditions environnementales aérobies à cause de leur déficience électronique générée par l'électro-attraction des groupes azoïques (Perrin et Scharff, 1999). Subséquemment, 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 être mille fois plus élevées que les concentrations initiales dans l'eau (Ben Mansour et al., 2011).

3.3. Législation sur le rejet des colorants dans l'environnement

Le Maroc, à l'instar des autres pays bien avancés au niveau de la protection de l'environnement, a promulgué des lois qui contraindraient les industriels en fonction de leur activité à s'équiper d'unités de traitement des eaux usées pour diminuer la charge polluante avant leur déversement dans les cours d'eau ou dans la mer ou de prélever des taxes spéciales sur la pollution. Ainsi, le Maroc est doté d'une réglementation (la loi marocaine n° 10-95 sur l'eau) sur les rejets d'effluents dans le milieu hydrique qui fixent les valeurs de rejets limites par les différentes industries afin maîtriser, en termes de quantité et qualité, la composition de

ces effluents, et pour permettre l'amélioration de la qualité des eaux de surface et des eaux souterraines. (Bulletin Officiel n° 4325 du 24 Rabii II 1416/20 septembre 1995).

4. Méthodes de traitement des colorants

La réglementation et la réduction des polluants hautement toxiques et dangereux, tels que les colorants, ont été reconnues comme des tâches essentielles par les principales agences et organisations environnementales. Ainsi, Un large éventail de méthodes a été développé pour l'élimination des colorants synthétiques des eaux usées afin de réduire leur impact sur l'environnement. Ces méthodes sont divisées en trois grandes catégories : physique, chimique ou biologique.

4.1. Méthodes physico-chimiques

Plusieurs procédés physiques, chimiques et physico-chimiques ont été utilisés pour le traitement des colorants, tel que : l'adsorption sur l'argile bentonite, l'ultrafiltration (UF), l'osmose inverse (RO), l'oxydation par l'ozone (O₃) (Wibulswas 2004 ; Metcalf, 2003). Bien que les méthodes physiques, chimiques et physicochimiques soient très rapides et efficaces contre certains colorants, ces dernières ont présenté une faible efficacité pour d'autres. Par ailleurs, elles se sont avérées très coûteuses et nécessitent des équipements sophistiqués (Hao et al., 2000). Plusieurs études ont également montré que ces méthodes peuvent être responsables de l'apparition de certains polluants organiques parfois plus toxiques que les molécules d'origine (Dos Santos et al., 2007 ; Robinson et al., 2001). Ainsi, elles sont peu efficaces compte tenu des normes exigées.

4.2. Méthodes biologiques

Les techniques biologiques ont reçu une prise de conscience omniprésente de la part de la communauté scientifique au cours de la dernière décennie. En raison de nombreux avantages par rapport aux méthodes conventionnelles. Elles sont reconnues comme une option de traitement prospectif pour les colorants dans diverses conditions (Ghosh et al., 2017, Ito et al., 2016). Avec une grande flexibilité dans la conception et les conditions de fonctionnement, les techniques de bioremédiation utilisent des microorganismes ou des plantes recombinants et naturels pour dégrader les matériaux dangereux (tels que les colorants dans des conditions aérobies ou anaérobies) en composés inoffensifs (dioxyde de carbone et eau) (Ghosh et al., 2017).

4.2.1. Phytoremédiation

La phytoremédiation est une technologie émergente prometteuse et peu coûteuse pour l'assainissement des sols et des eaux souterraines contaminés par des métaux lourds et des polluants organiques (Patil et al., 2009). Il s'agit d'un système autotrophique facile à gérer et qui est généralement approuvé par le public en raison de son attrait esthétique et sa durabilité environnementale (Ghodake et al., 2009a). Plusieurs plantes telles que *Blumea malcommi*, *Brassica juncea*, *Sargassum. vulgare* et *phaseolus mungo*, se sont révélées capables de dégrader les colorants de textile, (Ghodake et al., 2009 ; Kagalkar et al., 2009).

Il a été également rapporté que les cultures de racine de poils de *Tagetes patula* sont efficaces dans la décoloration du Rouge réactif 198 et que le système enzymatique de la plante est responsable de cette opération (Patil et al., 2009).

Cependant, l'application à grande échelle de la phytoremédiation est actuellement confrontée à un certain nombre d'obstacles, notamment le niveau de polluants toléré par la plante, la fraction biodisponible des contaminants et l'évapotranspiration des polluants organiques volatils, ainsi que l'implantation de vastes zones (Ghodake et al. 2009b).

4.2.2. Bioremédiation

La capacité des microorganismes à effectuer la décoloration a récemment reçu beaucoup d'attention. Cette approche biotechnologique a suscité un intérêt en ce qui concerne la lutte contre la pollution azoïque de manière éco-efficace et représente une alternative intéressante aux processus physiques et chimiques. En effet, les méthodes biologiques présentent plusieurs avantages à savoir le respect de l'environnement, la faible production de boues, la production des produits non toxiques ou ayant une minéralisation complète, et la faible consommation d'eau par rapport aux méthodes physico-chimiques (Banat et al., 1996 ; Rai et al., 2005).

L'atout principal des microorganismes dans la dépollution réside dans leur grande diversité. (Pandey et al., 2007). Il s'est avéré qu'une grande variété de micro-organismes sont capables de décolorer une large gamme de produits, y compris ; les bactéries (Dawkar et al., 2008, Jadhav et al., 2007, Kalyani et al., 2008, Saratale et al., 2009, Telke et al., 2008), les champignons (Fournier et al., 2004, Saratale et al., 2006), les levures (Jadhav et al., 2007, Lucas et al., 2006, Saratale et al., 2009), les actinomycètes (Machado et al., 2006) et les algues (Gupta et al., 2006, Parikh et Madamwar, 2005, Yan et Pan, 2004).

4.2.2.1. Les algues

Les algues sont omniprésentes et prennent de plus en plus une considération dans la dégradation des eaux usées de textiles.

Les macro-algues vertes *Cladophora* (Khataee et al., 2011) ont la capacité de dégrader principalement les colorants azoïques en raison de la présence d'une enzyme azoreductase. Plusieurs espèces de *Chlorella* et d'*Oscillatoria* sont trouvées également capables de dégrader les colorants azoïques en leurs amines aromatiques et peuvent en outre métaboliser ces derniers en composés organiques plus simples ou en CO₂ (Acuner et Dilek, 2004).

4.2.2.2. Les champignons

L'activité métabolique des champignons permettant de dégrader divers composés organiques complexes a été rapportée grâce à la production d'un grand nombre d'enzymes intracellulaires et extracellulaires (Asgher et al., 2008).

Les chercheurs se sont intéressés à de nombreux champignons. L'utilisation de l'espèce *P.chryso sporium* dans la décoloration des effluents textiles a été largement rapportée dans la littérature (Gomaa et al., 2008, Sharma et al., 2009, Faraco et al., 2009). D'autres champignons tels que *Aspergillus niger* (Fu et Viraraghavan, 2000, 2001), *Rhizopus arrhizus* (Zhou et Banks, 1991), *Rhizopus oryzae* (Gallagher et al., 1997), ont été également rapportés pour leur application dans la décoloration et/ou la biosorption des colorants azoïques. D'autres chercheurs ont, également, confirmé la capacité des souches fongiques appartenant à *Thamnidium elegans* et *Zygorhynchus moelleri* à dégrader efficacement certains composés aromatiques et phénoliques fortement toxiques (Papanikolaou et al., 2008 ; Bellou et al., 2014).

4.2.2.3. Les bactéries

La plupart des études sur la biodégradation des colorants azoïques se sont concentrées sur les bactéries. Ces dernières étaient largement utilisées pour éliminer les colorants azoïques en raison de leur activité élevée, de leur distribution étendue et de leur forte adaptation aux conditions environnementales (Pearce et al., 2003). Ainsi, différents paramètres ont été évalués par plusieurs types de bactéries pour accélérer le processus et développer des techniques efficaces de bioremédiation (Khehra et al., 2005). Le tableau 2 rassemble différents exemples des études menées dans ce sens et dont la décoloration a dépassé 50% pour l'ensemble des colorants utilisés.

Tableau 2- Quelques études concernant le traitement des colorants azoïques par les bactéries

Espèce	Conditions de décoloration	Efficacité de décoloration	Référence
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Dégradation aérobie, pH 7.0, N ₂ , 30 °C, 48 h	Orange de méthyle, 96.53%	Yu et al., 2012
<i>Micrococcus</i> sp.	Dégradation aérobie, pH 6, 35 °C, 48 h	Orange MR, 93.18%	Rajee et al., 2011
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Dégradation aérobie, 150 rpm, pH 7, 50 °C, 24 h	Orange II, 98%	Evangelista-Barreto et al., 2009
<i>Bacillus</i> sp.	Dégradation aérobie, pH 7, 40 °C, 24 h	Rouge de Congo, 85%	Sawhney et al., 2011
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Dégradation aérobie, pH 9, 30 °C, 10 h	Rouge de méthyle, 98%	Ayed et al., 2011
<i>Kocuria rosea</i>	Dégradation sous conditions statiques, pH 6.8, 30 °C, 12 h	Orange de méthyle, 100%	Parshetti et al., 2010

En effet, la décoloration des colorants azoïques par les bactéries implique le clivage des liaisons azoïques à l'aide de diverses enzymes et donneurs d'électrons (Brüschweiler & Merlot, 2017). Les intermédiaires résultants (tels que les amines aromatiques) de la minéralisation des colorants subissent une dégradation supplémentaire par les enzymes hydroxylase et oxygénase libérées par ces bactéries (Xiang et al., 2016).

4.2.2.4. Les levures

En comparaison avec les autres microorganismes, les levures présentent de nombreux avantages. Ces dernières présentent une croissance rapide, une capacité élevée à éliminer simultanément les colorants et les métaux lourds, tels que Pb (II) et Cd (II) (Ertugrul et al., 2008, Fairhead et Thony-Meyer, 2012), un taux de décoloration plus rapide que les champignons filamenteux et une capacité de survivre à des environnements défavorables (Martorell et al., 2012, Yu et Wen, 2005). Plusieurs espèces de levures ont été considérées

comme des adsorbants prometteurs capables d'éliminer des concentrations élevées de colorants. Les résultats de quelques études sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3- quelques études concernant le traitement des colorants azoïques par des levures

Espèce	Conditions de décoloration	Efficacité de décoloration	Référence
<i>Candida tropicalis</i>	Adsorption ; pH 3-7, 120 rpm, 28 °C, 2 jours	Basic Violet 3, 85.3%	Das et al., 2011
<i>Candida tropicalis</i>	Dégradation aérobie ; pH 3-9, 120 rpm, 28 °C, 30h	Acid Blue 93, 100%; Direct Red 28, 100%; Basic Violet 3, 90%	Charumathi et al., 2010
<i>Pichia fermentans</i>	Adsorption; pH 3, 120 rpm, 28 °C	Acid Blue 93, 100%; Direct Red 28, 95%; Basic Violet 3, 70%	Das et al., 2010
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Dégradation aérobie ; pH 7, 120 rpm, 30 °C, 24 h	Mélange de Remazol Red, Golden Yellow HER, GFL, Scarlet RR, Brown 3 REL, Brilliant Blue, 88%	Waghmode et al., 2011
<i>Paraconiothyrium variable</i>	Dégradation aérobie ; 40 °C, 3 h	Sudan Black, 84%; Brilliant Blue R, 93%	Aghaie Khouzani et al., 2012

5. Mécanisme d'élimination des colorants azoïques

La minéralisation des colorants azoïques par les microorganismes, spécialement les levures, implique plusieurs mécanismes complexes tels que la biodégradation et/ou la biosorption.

5.1. Biosorption

Le terme biosorption peut décrire tout système dans lequel une surface solide d'une matrice biologique interagit avec une entité, entraînant une réduction de sa concentration en solution (Gadd, 2009). Selon certaines études, le mécanisme de la biosorption peut inclure plusieurs autres mécanismes tels que : l'adsorption superficielle, l'accumulation, l'échange ionique, la complexation (coordination), la chélation et la micro-précipitation (Crini, 2006).

L'adsorption des colorants est dépendante des propriétés des colorants telles que la structure moléculaire, le type, le nombre et la position des substituants dans la molécule de colorant (Reife et Freeman, 1996). En effet, les parois cellulaires fongiques sont des structures macromoléculaires complexes constituées de chitines, de glucanes, de mannans et de protéines. Ils sont composés de nombreux groupes fonctionnels ; principalement de polysaccharides, de protéines et de lipides (Gadd, 1993). Les colorants peuvent interagir avec ces groupes actifs sur la surface cellulaire d'une manière différente. Certaines études ont montré que l'adsorption des colorants augmente en présence de groupements hydroxyle, nitro et azo dans la molécule de colorant, et diminue en présence des groupements sulfoniques (Reife et Freeman, 1996). Ce processus de liaison est souvent assez rapide pour être achevé en quelques heures (Chen et al. 2016).

La biosorption a été définie par la plupart des chercheurs comme un processus passif et métaboliquement indépendant (Malik, 2004, Gadd, 2009). Il peut être effectué soit par la biomasse morte, soit par des fragments de cellules et de tissus, présentant certains avantages notamment la facilité et la sécurité de la manipulation du matériel biologique. Cependant, le processus réalisé par des cellules vivantes via la complexation à la surface des parois cellulaires et/ou d'autres couches externes, est désigné sous le terme bioaccumulation (Malik, 2004), il est du coup plus lente et plus complexe vue l'implication de plusieurs variables inclus : pH, disponibilité de ligands, produits des activités métaboliques cellulaires, etc. (Gadd, 2009). Aksu (2003) a effectué une étude sur la bioaccumulation de trois colorants azoïques par les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, il a constaté que l'augmentation de la concentration du colorant a inhibé la croissance ainsi que la capacité de bioaccumulation a différé d'un colorant à l'autre.

5.2. Biodégradation

La biodégradation des colorants azoïques implique deux voies primordiales. Il s'agit de la réduction ou de l'oxydation. Le dispositif moléculaire mis en œuvre est constitué d'une gamme d'enzymes spécifiés dans l'une des voies citées.

5.2.1. Dégradation des colorants azoïques par des enzymes réductives

La dégradation des composés azoïques par les azoreductases a été montrée comme étant de nature presque exclusivement anaérobie. Celle-ci implique le clivage de liaisons azoïques (N=N) par un transfert de quatre électrons réducteurs et le colorant agit comme un accepteur final d'électrons, entraînant ainsi la formation de solutions incolores. Ces réactions nécessitent des cofacteurs réducteurs tels que le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺) pour catalyser la réduction enzymatique des colorants azoïques par les azoreductase (Ramalho et al., 2014). La présence de NADH-DCIP réductase, la riboflavine réductase et l'induction dans l'activité azoreductase au cours de la décoloration de Remazol avec *Galactomyces geotrichum* MTCC1360 a été rapportée par Waghmode et al. (2012).

Plusieurs recherches ont rapporté l'efficacité de dégradation des colorants azoïques récalcitrants dans des conditions anaérobies par des microorganismes anaérobies (en raison de leurs azoreductase) ou des enzymes azoreductase purifiées (Chen et al., 2005). Pourtant, d'autres études ont rapporté que les azoreductase peuvent aussi bien fonctionner dans des conditions aérobies qu'anaérobies, Chang et al. (2001) ont analysé l'activité de l'extrait cellulaire de *Pseudomonas luteola* dans des conditions anaérobies et aérobies et ont indiqué que la présence d'oxygène n'avait pas d'influence directe sur l'activité azoreductase.

5.2.2. Dégradation des colorants par des enzymes oxydatives

L'oxydation des colorants azoïques par les souches fongiques implique l'expression des enzymes lignolytiques extracellulaires non spécifiques (Majeau et al., 2010 ; Husain et Husain, 2011). En effet, les enzymes modifiant la lignine telles que la laccase, la manganèse peroxydase (MnP), la lignine peroxydase (LiP), la tyrosinase (Tyr) et, la N-déméthylase, sont largement apparentées à la biodécoloration (Chatha et al., 2017). Les réactions catalysées par ces enzymes extracellulaires sont des réactions d'oxydation. La lignine peroxydase, par exemple, catalyse l'oxydation des composés aromatiques non phénoliques, tandis que la manganèse peroxydase et l'acétate catalysent l'oxydation des composés phénoliques (McMullan et al., 2001).

PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Microorganismes et conditions de culture

1.1. Microorganismes

Les souches de levure utilisées dans cette étude font partie de la banque de microorganismes du laboratoire de biotechnologie microbienne, désignés par les noms M1 et M3. Ces dernières ont été isolées à partir de sites pollués par les effluents industriels de la ville de Fès (Maroc) (Bahafid et al., 2013). Ces souches ont été sélectionnées pour ce travail sur la base de leur capacité dépolluante du colorant azoïque le rouge de carmoisine (RC) (Danouche, 2017)

1.2. Milieux de culture

Afin d'évaluer la capacité dépolluante des souches étudiées vis-à-vis de différents colorants azoïques, les levures ont été cultivées dans le milieu YPG (2 % de peptone, 1 % d'extrait de levures et 2 % de glucose). Celui-ci est le milieu de culture le plus communément utilisé pour les levures permettant une bonne croissance des souches.

Toutefois, ce dernier n'a pas été adapté pour évaluer l'efficacité du traitement des colorants par les isolats de levures. Ainsi, une version de YPG semi-riche (0.2 % d'extrait de levure, 0.2 % du peptone et 2 % du glucose) développée par Bahafid et al. (2013), a été prouvée être plus convenable pour les tests de décoloration en éliminant l'interférence des différents constituants.

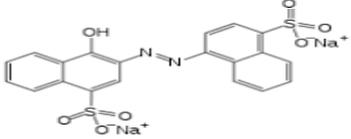
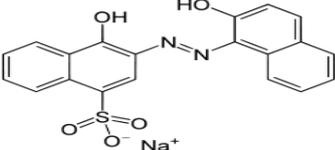
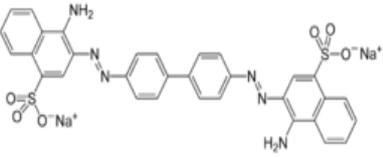
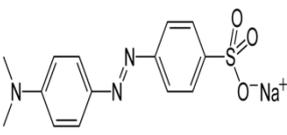
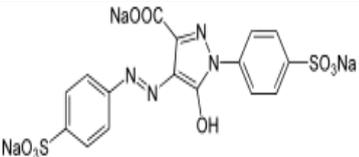
1.3. Préparation de l'inoculum

Afin d'estimer la concentration cellulaire en g/L des cellules de levures, le poids sec de la biomasse a été déterminé. Pour ceci, un volume fixe d'une culture cellulaire en phase exponentielle avec une densité optique connue (DO mesurée à 600 nm), a été centrifugé à 6000 rpm pendant 10 min. Le culot a été récupéré, lavé avec de l'eau distillée stérile, filtré sous vide à travers un filtre de nitrocellulose de 0,45 µm et séché à 37°C, pendant une nuit. Le poids sec du filtrat est ainsi exprimé en grammes par litre (Hela et al., 2002). La concentration cellulaire de l'échantillon a été déterminée par conversion de la DO en poids sec des cellules.

1.4. Colorants utilisés

Cinq colorants azoïques, dont les structures et les nominations sont présentées sur le tableau 4 ont été testés au cours de ce travail.

Tableau 4- Caractéristiques des colorants azoïques testés

Colorant	Synonyme	Structure	λ_{\max}
Carmoisine	C.I. Acid Red 14		515
Calcon	C.I. Mordant noir 17		520
Rouge Congo	C.I. Direct Red 28		490
Méthylorange	C.I. Acid Red 2		440
Tartrazine	C.I. Acid Yellow 23		430

2. Etude de la décoloration

2.1. Mise en évidence de la capacité de décoloration de différents colorants azoïques par les cellules de levures

Les souches de levures M1 et M3, ont été testées pour leur capacité de décoloration des différents colorants cités ci-dessus. Les cellules ont été cultivées dans 50 mL du milieu YPG semi-riche contenant 50 mg/L du colorant à tester. Les résultats de décoloration ont été enregistrés après 24 h d'incubation à 30°C sous agitation à 150 rpm/min. Ainsi, des aliquotes

de 1 mL ont été prélevés, centrifugés à 10 000 g pendant 10 min, puis analysés par spectrophotométrie à la longueur d'onde optimale d'absorption de chaque colorant. Des témoins abiotiques ont été préparés et incubés dans les mêmes conditions.

L'efficacité de décoloration a été évaluée en déterminant le pourcentage de décoloration (D %) selon la relation suivante (Lade et al., 2015) :

$$\% \text{ Décoloration} = \frac{DO_i - DO_f}{DO_i} \times 100$$

2.2. Etude de la cinétique de la décoloration du RC

Dans la suite de ce travail, nous avons choisi le RC comme un colorant azoïque modèle sur lequel nous avons effectué l'ensemble des tests traités.

Afin d'étudier l'effet du colorant RC sur la croissance des cellules, 50 mL du milieu YPG semi-riche stérile contenant 50 mg/L du rouge de carmoisine a été inoculé par les cellules de levure M1 et M3 (2 g/L) séparément. Après incubation à 30 °C sous agitation, la cinétique de croissance et de décoloration ont été suivies, comme décrit précédemment, en évaluant la densité optique (DO) respectivement à 600 nm et 515 nm à différents intervalles de temps. Des témoins abiotiques ont été préparés et incubés dans les mêmes conditions.

2.3. Effet de l'immobilisation des cellules sur la décoloration

L'effet de l'immobilisation des cellules sur la décoloration a été également évalué, elle a été réalisée en utilisant deux types de supports à des concentrations précises : l'alginate de sodium à 2 % (Ramsay et al., 2005) et le carboxyméthylcellulose à 2 % (Charumathi et al., 2010).

➤ Préparation des supports

Une quantité de 1 g de l'alginate de Sodium et de CMC a été dissoute dans 25 mL de l'eau distillé et stérilisée par autoclavage (20 min, 121°C)

➤ Immobilisation des cellules

Un volume de 25 mL d'une culture cellulaire, ayant une concentration cellulaire de 2 g/L, a été mélangé avec 25 mL d'une solution de support déjà préparée. L'homogénéisation est effectuée lentement sous agitation.

- Immobilisation des cellules sur l'Alginate de sodium

Le mélange cellules-alginate de Sodium, après homogénéisation, a été récupéré par une seringue stérile, puis injecté dans une solution de CaCl_2 (0,2 M) stérile doucement de façon à permettre la création de petites billes dont le diamètre ne dépasse pas les 2 mm. Dans le but d'améliorer leur stabilité mécanique ces dernières ont été conservées dans la solution de CaCl_2 (0,2 M) à 4°C pendant 2 h.

- Immobilisation des cellules sur le CMC

Le mélange cellules-CMC a été homogénéisé, récupéré par une seringue stérile, et par la suite injecté dans un flacon contenant la solution FeCl_3 (0,05 M). Les billes formées ont été conservées à 4°C pendant 1 h dans cette solution.

Dans le but de tester la capacité de décoloration des cellules immobiles vis-à-vis du RC. Les billes déjà préparées ont été lavées trois fois par l'eau distillée stérile, puis mises en suspension dans le tampon acétate (pH= 4) contenant 25 mg/L du colorant. Après incubation à 30°C sous agitation (150 rpm), le dosage du RC a été effectué en suivant les mêmes étapes que précédemment (section 2.1). Pour chacun des supports utilisés, un témoin a été préparé avec l'eau distillé stérile.

3. Etude des mécanismes de la décoloration du RC

3.1. Etude de la biodégradation

3.1.1. Extraction des produits de dégradation

Les produits obtenus après la dégradation complète du RC (décoloration totale), validée par la mesure de l'absorbance, ont été extraits par l'ajout d'un volume égal de l'acétate d'éthyle (Jadhav et al., 2010). Après centrifugation à 4000 rpm (5°C, 20 min) le Na_2SO_4 est rajouté à la phase organique, filtrée par la suite à travers un filtre de nitrocellulose 0.45 μm . Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans le méthanol 90 %.

3.1.2. Caractérisation des produits de dégradation

Différentes techniques ont été mises en œuvre afin de pouvoir caractériser les produits de dégradation du RC par les souches M1 et M3 :

- **Spectroscopie UV-visible** : La spectroscopie UV-Visible est une technique qui permet de déterminer qualitativement et quantitativement la substance analysée dans ce domaine spectral. Afin d'obtenir un spectre UV-visible, la solution est soumise aux rayonnements dont la longueur d'onde est comprise dans l'intervalle 200-400 nm (domaine des ultraviolets) et dans

l'intervalle 400-800 nm (domaine de la lumière visible). Pour chaque longueur d'onde, l'absorbance est mesurée et les données recueillies sont utilisées pour tracer les variations de l'absorbance (en ordonnées) en fonction de la longueur d'onde (en abscisse). Le graphique ainsi obtenu constitue un spectre UV-visible (Dergal et al., 2013).

Pour réaliser ce test, les suspensions des cellules qui ont présenté une décoloration totale ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 10 min. le surnageant a été récupéré puis analysé par un spectrophotomètre UV-visible. L'absorbance a été mesurée dans un intervalle de 300 à 800 nm.

- **Chromatographie sur couche mince (CCM)** : Les produits de dégradation extraits ont été déposés à l'aide des tubes capillaires en verre sur un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium. L'éluant étant un mélange du méthanol : eau distillé (9 :1). Après l'éluion, les constituants du mélange se séparent par migration différentielle, et les spots ont été visualisés sous des radiations UV. Le rapport frontal est calculé selon la formule suivante :

$$R_f = h/H$$

h : est la distance parcourue par les constituant du mélange. (Jadhav et al., 2007).

- **Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)** : Afin d'identifier les métabolites résultants de la dégradation du rouge de carmoisine par les souches M1 et M3 une analyse par la GC/MS a été menée à la cité d'innovation.

La température de l'injecteur a été maintenue à 280 °C, permettant la volatilisation des échantillons. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur balayant en continu la colonne, entraînant ainsi les composés en fonction de leur affinité avec le revêtement du polymère (la phase stationnaire). Ces derniers subissent ensuite une ionisation électronique. Les ions formés sont séparés sous l'effet d'un champ magnétique, et sont récoltés sur un détecteur qui joue le rôle d'amplificateur de signal. Les composés ont été identifiés sur la base du rapport masse/charge (m/z) (Jadhav et al., 2008).

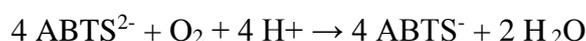
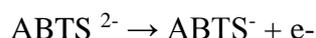
– **Spectroscopie IRTF** : Afin de caractériser la structure moléculaire des produits de dégradation, une analyse par la spectroscopie IRTF a été réalisée à la cité d'innovation. Les produits de dégradation de M1, M3, et le colorant ont été testés, les spectres infrarouges ont été obtenus dans un mode de transmission (4000-400cm⁻¹).

3.1.3. Mesure de l'activité enzymatique de la laccase

L'activité laccase a été mesurée dans le surnageant des cultures de levures M1 et M3 additionnées ou non du rouge de carmoisine

En effet, l'activité enzymatique (A) d'une solution d'enzyme est calculée par rapport à un substrat donné. Elle est exprimée en unité U/mL d'enzyme, sachant que U est le nombre de μ moles de substrat transformé par minute par l'enzyme (μ mole/min). Le substrat de référence utilisé pour déterminer l'activité enzymatique de la laccase est l'acide 2, 2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) (Jadhav et al., 2010)

L'ABTS²⁻ est un composé incolore, mais son oxydation (par la laccase) en un radical stable provoque l'apparition d'une coloration verte permettant ainsi d'effectuer des mesures de spectrophotométrie UV-visible à 420 nm. Les réactions mises en jeu sont :



3.2. Etude de la biosorption

3.2.1. Effet de l'inactivation des cellules sur la décoloration

Dans le but de comparer la capacité de décoloration des cellules vivantes à celle des cellules mortes vis-à-vis du colorant RC, ces dernières ont étéensemencées (2 g/L) dans 50 mL du milieu YPG semi-riche additionné d'une concentration de 50 mg/L du rouge de carmoisine. Dans le cas des cellules mortes, un traitement des cellules par autoclavage à 120 °C pendant 20min a été réalisé avant l'ajout du colorant. Après incubation à 30 °C sous agitation (150 rpm), le pourcentage de décoloration ont été déterminés comme décrit précédemment.

3.2.2. Modélisation des isothermes d'adsorption

Les isothermes sont les relations d'équilibre entre la concentration de l'adsorbat sur la phase solide et sa concentration dans la phase liquide. Ces derniers jouent un rôle important dans la compréhension du mécanisme d'adsorption en expliquant comment l'adsorbant va interagir avec l'adsorbat (adsorption en monocouche ou en multicouche). En outre ils nous permettent de donner une idée sur la capacité maximale d'adsorption (Q_{\max}).

Les échantillons utilisés pour construire ces isothermes ont été préparés en ensemencant une concentration de 2 g/L de cellules mortes (autoclavées à 121°C pendant 20 min) dans 50 mL du tampon acétate additionné d'une concentration initiale C_0 du RC qui varie de 50 à 200 mg/L. les différents échantillons ont été incubés à 30°C sous agitation 150 rpm/min. A l'équilibre, l'adsorbant chargé en polluant est séparé de la solution. La cinétique de l'adsorption a été suivie comme décrit précédemment (section 2.1).

La quantité de rouge de carmoisine adsorbé, nommé Q_e , est quantifiée selon l'équation suivante (Al-Mardini et al., 2008) :

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{M}$$

- C_0 (mg/L) la concentration initiale du colorant
- C_e (mg/L) est la concentration à l'équilibre
- V (L) est le volume
- M (g) est la masse de l'adsorbant (biomasse).

Plusieurs modèles d'isothermes sont présentés dans la littérature (Srinivasan et al., 2010), pourtant les modèles de Langmuir et Freundlich sont parmi les isothermes les plus couramment utilisés décrivant les systèmes de sorption solide-liquide. Le modèle le mieux adapté peut être choisi en fonction des valeurs du coefficient de corrélation de régression linéaire R^2 .

3.2.2.1. Modèle de Langmuir

Selon le modèle de Langmuir, on suppose que l'adsorption se fait sur des sites homogènes spécifiques dans l'adsorbant. Celui-ci est utilisé avec succès pour de nombreux processus d'adsorption monocouche (Podkoscielny et Nieszporek, 2011).

L'équation de Langmuir est exprimée par l'équation suivante (Langmuir, 1918) :

$$Q_e = \frac{Q_m \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e}$$

- Q_e est la quantité de colorant adsorbée à l'équilibre (mg/g)
- C_e est la concentration à l'équilibre du colorant en solution (mg / L)
- Q_m est la capacité d'adsorption maximale (mg/g)
- K_L est la constante isotherme pour Langmuir ($L \cdot mg^{-1}$).

La forme linéarisée de l'isotherme de Langmuir a pour équation (Limousin et al., 2007 ; Gimbert et al., 2008.) :

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{C_e}{Q_m} + \frac{1}{K_L \cdot Q_m}$$

R_L est un rapport sans unité proposé par McKay et al. (1982). Il est défini comme suit :

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \cdot C_0}$$

Si $R_L = 0$ l'adsorption est irréversible ; $R_L = 1$ l'adsorption est linéaire ; $R_L > 1$ l'adsorption est non-favorable, and $0 < R_L < 1$ l'adsorption est favorable. Ainsi, l'adsorption est d'autant plus favorable que R_L tend vers zéro (McKay et al. 1982 ; Rao et al., 2007 ; Tian et al., 2010).

3.2.2.2. Modèle de Freundlich

Selon Le modèle de Freundlich, on considère une surface d'adsorption hétérogène ayant des sites disponibles et inégaux avec les différentes énergies d'adsorption (Saber-Samandari et Heydaripour, 2015).

Le modèle isotherme d'adsorption de Freundlich est représenté comme suit (Freundlich, 1906):

$$Q_e = K_f C_e^{(1/n)}$$

Où Q_e est la quantité d'entités adsorbées à l'équilibre (mg/g), ' C_e ' est la concentration d'équilibre du colorant en solution (mg/L), ' K_f ' (L/mg) est la capacité de l'adsorbant et ' n ' est l'intensité d'adsorption pour Freundlich.

La forme linéarisée a pour équation (Hamdaoui et al., 2007) :

$$\ln Q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e$$

La constante $1/n$ (adimensionnelle) donne une indication sur l'intensité de l'adsorption. Il est généralement admis que de faibles valeurs de $1/n$ ($0,1 < 1/n < 0,5$) sont caractéristiques d'une bonne adsorption, alors que des valeurs plus élevées révèlent une adsorption modérée ($0,5 < 1/n < 1$) ou faible ($1/n > 1$) (Hamdaoui et Naffrechoux, 2007).

3.2.3. Etude de la cinétique d'adsorption

La cinétique du phénomène d'adsorption est déterminée par le transfert de matière à l'interface liquide - solide où sont localisées toutes les résistances au transfert. L'équation fondamentale est celle qui régit les phénomènes de transfert de matière en général entre deux phases, en exprimant le flux d'adsorption proportionnellement à l'écart entre la quantité adsorbée q_t à l'instant t et la quantité adsorbée à l'équilibre q_e .

3.2.3.1. Modèle de la cinétique pseudo premier ordre (modèle Lagergren)

Lagergren (1898) a proposé un modèle cinétique de pseudo premier ordre exprimé par la relation suivante :

$$\frac{dq_t}{dt} = K_1(q_e - q_t)$$

Avec k_1 la constante de vitesse pour une cinétique du pseudo premier ordre (min^{-1}), q_t et q_e les capacités d'adsorption à l'instant t ($\text{mg d'adsorbat} / \text{g d'adsorbant}$) et à l'équilibre [$\text{mg d'adsorbat} / \text{g d'adsorbant}$], respectivement.

En intégrant l'équation (Nandi et al., 2009) :

$$\ln (q_e - q_t) = \ln q_e - K_1 t$$

3.2.3.2. Modèle de la cinétique pseudo deuxième ordre

Une expression également très souvent utilisée est celle du pseudo-deuxième ordre (Ho et McKay, 1999). Ce modèle suggère l'existence d'une chimisorption, un échange d'électrons par exemple entre la molécule d'adsorbat et l'adsorbant solide. Il est représenté par la formule suivante :

$$\frac{dq_t}{t} = k_2 (q_e - q_t)^2$$

Avec k_2 la constante de vitesse pour une cinétique du deuxième ordre ($\text{g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), q_t et q_e les capacités d'adsorption à l'instant t ($\text{mg d'adsorbat} / \text{g d'adsorbant}$) et à l'équilibre ($\text{mg d'adsorbat} / \text{g d'adsorbant}$), respectivement.

Par intégrale on obtient :

$$\frac{t}{q_t} = t \cdot \frac{1}{q_e^2} + \frac{1}{K_2 q_e^2}$$

3.2.3.3. Modèle de la diffusion intra particulaire

Les articles faisant référence à cette approche cinétique de diffusion intra-particulaire s'appuient généralement sur des travaux de Weber et Morris (1963). Le modèle de diffusion intra-particulaire est représenté par l'équation suivante

$$q_t = K_i t^{\frac{1}{2}} + C$$

Avec K_i la constante de la diffusion intra-particulaire en ($\text{mg/g} \cdot \text{min}^{1/2}$), C ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) : la valeur de l'ordonnée à l'origine qui donne une indication sur l'épaisseur de la couche limite.

3.2.4. Analyse et caractérisation de l'adsorbant (cellules de levures)

3.2.4.1. Analyse par Microscopie électronique à balayage

Afin de caractériser la surface cellulaire, une analyse par la microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée à la cité d'innovation. Cette technique est capable de produire

des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière.

Les échantillons ont été préparés selon le protocole de Bhowmick et al. (2009). Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de Petri contenant le milieu YPG additionné ou non du RC en présence de lames en verre pendant 8 heures. Les lames ont été ensuite lavées par le tampon PBS (0,1 M), immergées dans le glutaraldéhyde 2 % pendant 2 h à température ambiante, puis lavées trois fois au PBS. Enfin, les lames ont été trempées pendant 15 min dans des bains d'éthanol à concentration croissante 50 %, 70 %, 90 % et 100 %.

3.2.4.2. Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)

Dans le but de caractériser les différents groupements qui interviennent dans le processus de l'adsorption, une étude par la spectroscopie infra-rouge a été menée. En effet, la spectroscopie IRTF est une méthode essentiellement qualitative, qui permet d'obtenir des informations structurales sur une molécule donnée. Cette technique consiste à mesurer la quantité de lumière absorbée par l'échantillon en fonction de la longueur d'ondes émise par un faisceau infrarouge permettant ainsi d'obtenir un spectre d'absorption. Ce dernier permet, en comparaison avec le témoin, de mettre en évidence ces groupements et d'étudier les changements qui ont pris lieu.

Les deux souches M1 et M3 (vivantes/mortes) ont étéensemencées dans le milieu YPG semi-riche et incubées pendant 24 h à 30°C sous agitation 150 rpm. Les cellules ont été mises en suspension dans le tampon acétate, additionnées de 50 mg/L de RC, puis centrifugées (5000 g, 10 min). Le culot a été récupéré, lavé soigneusement, et séché à 37 °C pendant une nuit.

Les échantillons ont été mélangés avec le KBr pure selon le ratio (95 :5), le culot a été fixé sur le porte-échantillon et l'analyse a été effectuée dans l'intervalle 400-4000 cm^{-1} .

3.2.5. Criblage des facteurs influents la biosorption

La planification expérimentale destinée à optimiser les résultats est une nouvelle méthodologie développée au cours de ces dernières années. C'est un outil pratique qui permet d'obtenir un maximum d'informations en un minimum d'expériences. Il présente des avantages nombreux à savoir une modélisation simple des résultats, la prise en compte d'éventuelles interactions entre les facteurs et la recherche d'une réponse optimale.

La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée Y , porte le nom de réponse. Les variables qui peuvent modifier la réponse sont appelés facteurs. La modélisation mathématique consiste à trouver une fonction tel que :

$$Y = f \{x_1, x_2, x_3, \dots, x_i\}$$

Y : la grandeur d'intérêt (réponse), mesurée au cours de l'expérimentation.

x_i : représente les niveaux (+1/-1) de différents facteurs, ces valeurs sont parfaitement connues puisqu'elles sont définies auparavant.

3.2.5.1. Choix du plan d'expérience

Le plan classique le plus proche est un plan de Plackett et Burman de 12 essais. Ces plans peuvent se construire à la main en suivant les règles énoncées par Plackett et Burman, mais il est plus commode de faire appel à un logiciel de plans d'expériences.

3.2.5.2. Domaine expérimental des facteurs et des réponses

Dans cette étude cinq facteurs (pH, Température, biomasse, concentration du colorant et agitation) ont été explorés simultanément pour évaluer l'effet de chaque facteur sur la décoloration. Les niveaux et les valeurs correspondantes à chaque facteur sont indiqués sur le tableau 5. Les expériences menées sont représentées sur le tableau 6.

Tableau 5- Valeurs expérimentales et niveaux correspondants pour les facteurs testés (X_i)

	Facteur	Niveau	Valeur
X1	Température (°C)	-1	20
		+1	37
X2	pH	-1	3
		+1	8
X3	Biomasse (g/L)	-1	0.5
		+1	2
X4	Colorant (mg/L)	-1	25
		+1	150
X5	Agitation (rpm)	-1	0
		+1	150

Le % de décoloration est la réponse considérée dans cette analyse, il est calculé comme déjà décrit dans la section (2.1). Le modèle mathématique résultant est un polynôme d'ordre 1 :

$$Y = b_0 + b_1 * X_1 + b_2 * X_2 + b_3 * X_3 + b_4 * X_4 + b_5 * X_5 + \varepsilon$$

Avec :

b_0 : représente la valeur moyenne théorique des réponses.

b_1, b_2, b_3, b_4 et b_5 sont les effets principaux des facteurs X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 respectivement.

ε : est un terme d'erreur.

Tableau 6- matrice de planification des expériences à 5 facteurs

N° exp	Température	pH	Biomasse	Colorant	Agitation
1	37	8	0.5	150	150
2	20	8	2	25	150
3	37	3	2	150	0
4	20	8	0.5	150	150
5	20	3	2	25	150
6	20	3	0.5	150	0
7	37	3	0.5	25	150
8	37	8	0.5	25	0
9	37	8	2	25	0
10	20	8	2	150	0
11	37	3	2	150	150
12	20	3	0.5	25	0

3.2.5.3. Analyse statistique

Le logiciel utilisé dans cette étude est appelé **NemrodW**, il est exclusivement dédié à la construction et l'analyse des plans d'expérience. Il présente de plus l'avantage d'être continuellement amélioré par une équipe active dans la "méthodologie de la recherche expérimentale" (<http://www.nemrodw.com/>).

Les équations de régression polynomiale de premier ordre ont été établies sur la base des données expérimentales. La signification statistique a été évaluée en utilisant l'analyse de variance (ANOVA) avec $p < 0,05$.

4. Evaluation de la toxicité des produits de dégradation

4.1. Protocole

Afin d'évaluer la phytotoxicité du colorant avant et après traitement par les souches de levures, ce test a été mené sur les graines de luzerne (*Medicago sativa*). Pour ceci, les graines ont subi un traitement préalable, permettant la désinfection de leur surface, par l'alcool (95%) et l'hypochlorite (30%) pendant respectivement 15 min et 10 min. Elles ont été ensuite rincées à l'eau distillée stérile plusieurs fois et mises à germer.

Des boîtes de Petri préparées à l'avance contenant 0,7% de l'eau gélosée ont été utilisées comme support permettant la germination des graines. Après avoir déposé les graines (30 graines par boîte), un volume de 5 mL de la solution contenant le colorant, traité par les souches M1 et M3, est coulée à la surface de la gélose. Les graines ont été, par la suite, mises à germer pendant 5 jours à 30 °C (Hea et al., 2018).

Une solution de colorant non traité est utilisée comme témoin négatif. Des témoins positifs ont été également préparés dans les mêmes conditions en remplaçant la solution contaminée (traitée ou non) par l'eau distillée. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement.

4.2. Analyse statistique

Le pourcentage de germination a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ germination} = \frac{\text{nombre de graines germés}}{\text{nombre total des graines}} \times 100$$

L'outil statistique ANOVA a été appliqué pour traiter les données en termes de signification et validité. Le risque d'erreur était fixé à 5 % au-delà duquel les différences ne sont pas significatives entre les échantillons.

PARTIE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Décoloration des colorants azoïques par les souches de levures

1.1. Mise en évidence de la capacité de décoloration des souches

Afin d'évaluer le pouvoir de décoloration des isolats M1 et M3, cinq colorants azoïques ont été choisis, le rouge de carmoisine (RC), le méthylorange, le rouge Congo, le calcon et la tartrazine. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 1.

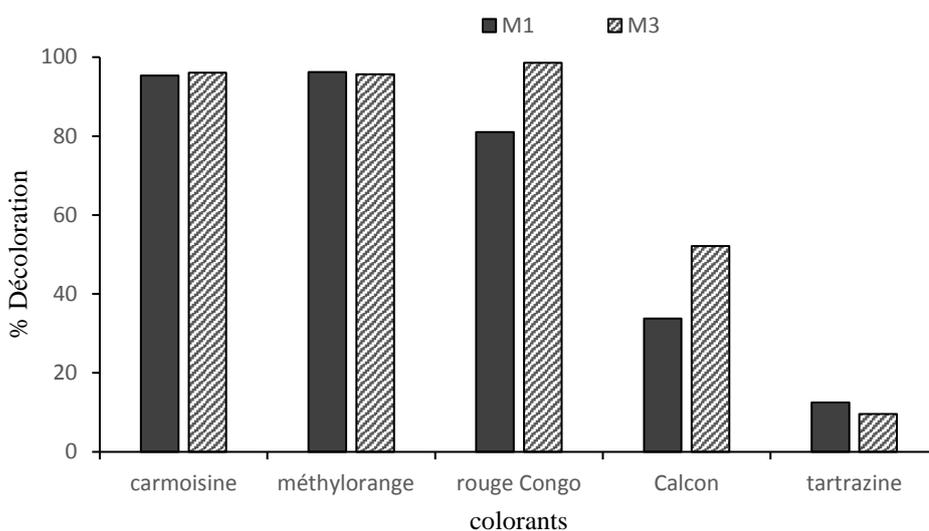


Figure 1: Pourcentage de décoloration de cinq colorants azoïques (50 mg/L) par les souches de levures M1 et M3 après 24h à 30°C et 150 rpm

Les résultats montrent que la capacité de la décoloration varie d'une souche à l'autre et d'un colorant à l'autre. En effet, le rouge de carmoisine (RC) a été efficacement dégradé avec un taux de décoloration qui a atteint 95,37 % et 96,05 %, respectivement pour M1 et M3. Le méthylorange a été également dégradé avec des taux de décoloration de 96,21 % et 95,64 %, respectivement pour M1 et M3. Concernant le colorant rouge de Congo qui est un colorant diazoïque, il a été décoloré avec des taux dépassant 80 % pour les deux souches. Quant au calcon, la décoloration a été relativement plus importante pour M3 avec un taux de 52,16 % par rapport à M1 dont le maximum de décoloration a atteint 33,75 %. Toutefois, le taux de décoloration de la tartrazine, était faible pour les deux souches, en présentant un pourcentage de 12,47 % et 9,61 %, respectivement pour M1 et M3.

Des résultats similaires ont été obtenus par Tan et al. (2013). Ces derniers ont montré que la capacité de décoloration du RC par *candida tropicalis* TL-F1 a atteint 90,7 % au bout de 16 h pour une concentration initiale de 20 mg/L. La souche *Magnusiomyces ingens* LH-F1 isolée

par la même équipe de recherche s'est avérée capable de dégrader 97,37% de ce colorant à une concentration de 20 mg/L pendant 8 h dans des conditions d'aérobic (Tan et al., 2014).

Des résultats semblables ont été également rapportés par Parshetti et al. (2010) dans le cas de l'orange de méthyle. Ces derniers ont trouvé 100 % de décoloration de ce colorant (50 mg/L) par la souche *Kocuri arosea* (MTCC 1532) dans des conditions statiques. L'induction significative de deux enzymes réductases (NADH-DCIP réductase et azoréductase) suggère leur implication dans cette décoloration. Il a été également signalé que *Rhodopseudomonas palustris* et *Rhodobacter sphaeroides* pouvaient décolorer le carmoisine et le méthylorange respectivement (Liu et al., 2006 ; Song et al., 2003). En outre, d'après une étude réalisée par Sunkar et al. (2015), la souche *Citrobacter freundii* isolée à partir d'un effluent de textile s'est montrée capable d'éliminer 82 % du calcon (MB17) (100 mg/L) au bout de 24h.

La décoloration des différents milieux contenant les colorants en présence des deux souches étudiées peut être expliquée par l'intervention d'un ou plusieurs mécanismes. En effet, d'après des recherches réalisées, plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'élimination de ces colorants tels que : la biodégradation, la bioaccumulation ou l'adsorption du colorant aux cellules microbiennes (Chen et al., 2003, Aksu, 2003). Ces mécanismes d'élimination des colorants peuvent être jugés en observant la couleur du culot. Les cellules deviennent colorées dans le cas de l'adsorption ou de l'accumulation, alors que les cellules exerçant la biodégradation conservent leur couleur originale (Yu et Wen, 2005). Dans notre étude, nous avons remarqué que le surnageant et le culot récupéré des cultures des deux souches, après décoloration du rouge de carmoisine et de méthylorange, sont clairs. Ceci nous permet de suggérer que l'élimination de ces deux colorants par les deux souches testées est essentiellement réalisée par le mécanisme de la biodégradation. Cependant, dans le cas des autres colorants (tartrazine, rouge de Congo et calcon), la couleur et l'aspect du culot récupéré, pour les deux souches après le test de décoloration, a montré une couleur assez différente de la couleur initiale (résultat non présenté). Ainsi, on suppose que le mécanisme général utilisé dans l'élimination de ces colorants par ces souches est la bioaccumulation.

La différence dans le taux de décoloration des différents colorants testés peut être expliquée non seulement par le mécanisme de décoloration de chaque souche mais également par la nature du colorant étudié. En effet, des recherches ont montré que la capacité de décoloration dépend de la structure moléculaire du colorant examiné. Par exemple, un simple changement au niveau d'un substituant. Ce serait le cas du RC et du MB17 ou le remplacement

du groupement sulfonate par l'hydroxyle aurait fortement influencé la décoloration en l'abaissant de 96,05 % à 50,16 % (M3), et de 95,37 % à 33,75 % (M1). En effet, la structure du colorant joue un rôle clé dans la décoloration. Il a été rapporté que les colorants azoïques portant des groupes attracteurs d'électrons, tels que SO_3^- , sont plus faciles à dégrader que ceux ayant des groupes libérant des électrons, tels que $-\text{NH}$ -triazine (Pricelius et al., 2007). Par conséquent, les colorants azoïques qui contiennent plus de groupes électronucléaires montrent une décoloration plus rapide. Les mêmes études ont montré que si ces groupes sont en position para ou ortho par rapport à la liaison azoïque, la dégradation du colorant se produit plus rapidement que s'ils sont en position méta. Ceci a été expliqué par le fait que ces groupes en position méta fournissent un effet de résonance plus efficace et le colorant azoïque devient fortement électrophile permettant une réduction rapide (Pricelius et al., 2007 ; Chen et al., 2011).

1.2. Cinétique de la croissance et de la décoloration du RC par les cellules de levures

Les résultats de la cinétique de décoloration de 50 mg/L de RC par M1 et M3 sont représentés sur la figure 2.

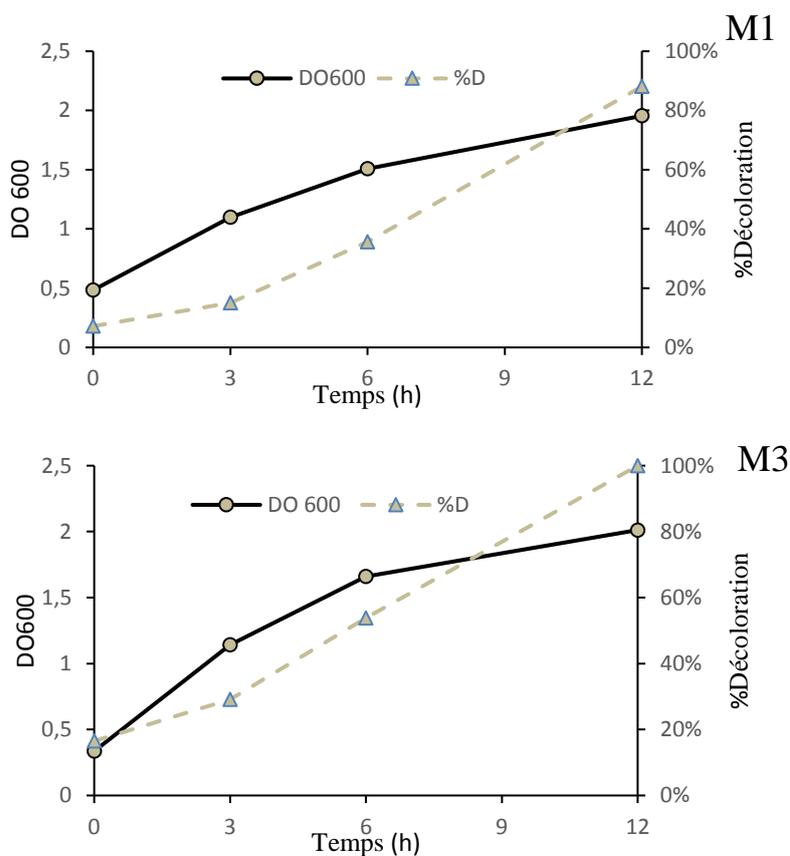


Figure 2: Cinétique de la croissance et de la décoloration du RC (50 mg/L) par les souches M1 et M3

Les résultats illustrés dans la figure 2 montrent qu'en présence de RC à une concentration de 50 mg/L, la croissance des cellules des levures (phase exponentielle) s'accompagne de la décoloration du RC. Dans le cas de la souche M1, la décoloration du RC (50 mg/L) augmente progressivement et atteint un pourcentage de 15 %, 36,68 %, et 88,11 %, respectivement au bout de 3h, 6h et 12h.

Tandis que pour la souche M3, le taux de décoloration a augmenté régulièrement de 29 % au bout de 3h jusqu'à une décoloration totale (100 %) après 12h d'incubation.

Nous remarquons que le taux de la décoloration augmente avec l'augmentation de la croissance cellulaire. Ceci nous permet de suggérer que le processus de décoloration est dépendant du métabolisme et de la croissance cellulaire.

Il a été indiqué que les colorants azoïques portant sur leurs cycles aromatiques un groupe acide sulfonique (SO_3H) (c'est le cas de RC) inhibaient fortement la croissance des microorganismes, lorsqu'ils sont présents à de fortes concentrations (Chen et al., 2003 ; Kalyani et al., 2009). D'autres études ont expliqué ceci par une inhibition de l'activité métabolique responsable de la décoloration par blocage des sites actifs de l'azoreductase (enzyme responsable de la rupture de la liaison azoïque du groupement chromophore) (Jadhav et al., 2008 ; Saratale et al., 2009 ; Tony et al., 2009).

Plusieurs paramètres peuvent également influencer la décoloration. Il a été rapporté que la présence d'oxygène peut soit favoriser ou inhiber la dégradation microbienne des colorants azoïques. L'agitation augmente le transfert de la masse et d'oxygène entre les cellules et le milieu, et l'activité enzymatique peut dépendre de la présence d'oxygène si le mécanisme est aérobie.

Des études ont montré que l'augmentation de la taille de l'inoculum dans le milieu influence positivement le taux de décoloration et diminue significativement le temps requis pour la décoloration (Shah et al., 2013 ; Sadeghi et al. 2014 ; Danouche, 2017)

En effet, le temps nécessaire pour décolorer le rouge de méthyle en utilisant une souche de *Micrococcus* a été réduit de 24 à 6 h sous apport d'oxygène (Olukanni et al., 2009) et la décoloration d'Orange II avec *A. niger* s'est améliorée sous l'agitation (84 %) par rapport à la croissance statique (61 %) (Ali et al., 2009).

1.3.Effet de l'immobilisation des cellules sur la décoloration

En vue d'étudier l'effet de l'immobilisation des cellules sur la décoloration du RC, deux matrices ont été choisies : l'alginate de Na et le carboxyméthylcellulose (CMC). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.

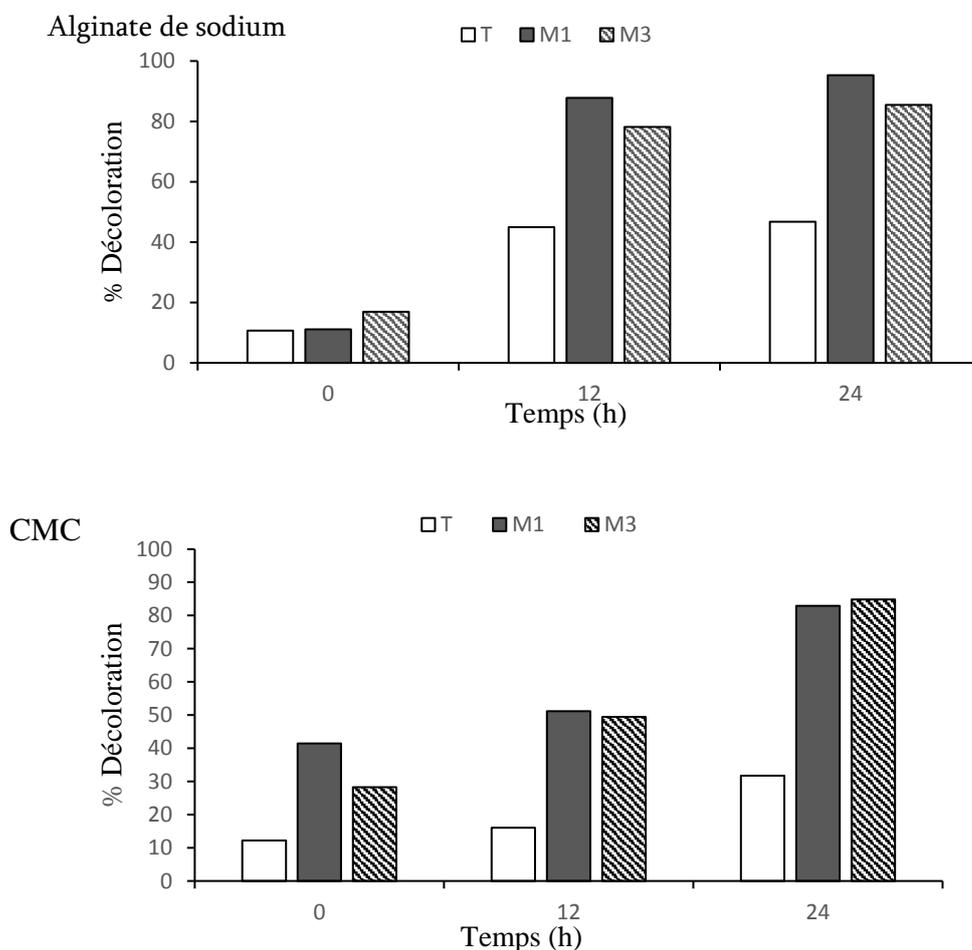


Figure 3: % Décoloration du RC (25mg/L) par les cellules des levures M1 et M3 immobilisées sur l'alginate de sodium et sur le CMC, à 30°C et 150rpm

D'après la figure 3, on remarque que la nature du support sur lequel les cellules sont immobilisées influence la vitesse et le taux de décoloration. En effet, le maximum de décoloration a été enregistré en utilisant l'alginate de sodium comme support.

Au bout de 12 h d'incubation, les deux souches ont montré un taux de décoloration élevé dans le cas de l'alginate de sodium en présentant un pourcentage de 87 % et 78 %, respectivement pour la souche M1 et M3. Toutefois, ce pourcentage était seulement de 51 % et 49 %, respectivement pour M1 et M3, dans le cas du CMC. Après 24h d'incubation sous

agitation le taux de décoloration a augmenté en atteignant 95,3 % (M1) et 85,4 % (M3) lorsque les cellules ont été immobilisées dans l'alginate de sodium et 82,9 % (M1) et 84,8 % (M3) dans le cas du CMC.

Des résultats similaires ont été trouvés par Charumathi et al. (2010). Ces derniers ont testé la décoloration de 10 mg/L du basic violet par *candida tropicalis* sur différents supports d'immobilisation y compris le CMC et l'alginate-Na. Ils ont constaté que l'efficacité de décoloration par cette souche est meilleure dans le cas de l'immobilisation par l'alginate-Na (100 % de décoloration), par rapport au CMC (70 % de décoloration).

D'après Usha et al. (2010), l'immobilisation provoque une stabilisation de la membrane en rendant celle-ci moins perméable aux substances toxiques ce qui est supposé être responsable de la protection des cellules immobilisées. Cependant la concentration du support utilisé peut interférer dans la diffusion des molécules particulièrement les nutriments ce qui a été confirmé par Charumathi et al. (2010), qu'une concentration de l'alginate de sodium qui dépasse 3 % est défavorable pour la décoloration de basic violet 3 en utilisant les cellules de *C. tropicalis*.

2. Etude du mécanisme de la décoloration

2.1. Etude de la biodégradation

2.1.1. Analyse de la décoloration par la spectroscopie UV-visible

L'analyse du surnageant des cultures par la spectroscopie UV-visible après la décoloration du milieu a été effectuée. La figure 4 présente le spectre d'absorption, du colorant RC (50 mg/L) et ses produits de dégradation par les souches M1 et M3 (24h, 30°C, 150 rpm), balayé par un spectrophotomètre UV-VIS de 300 à 800 nm.

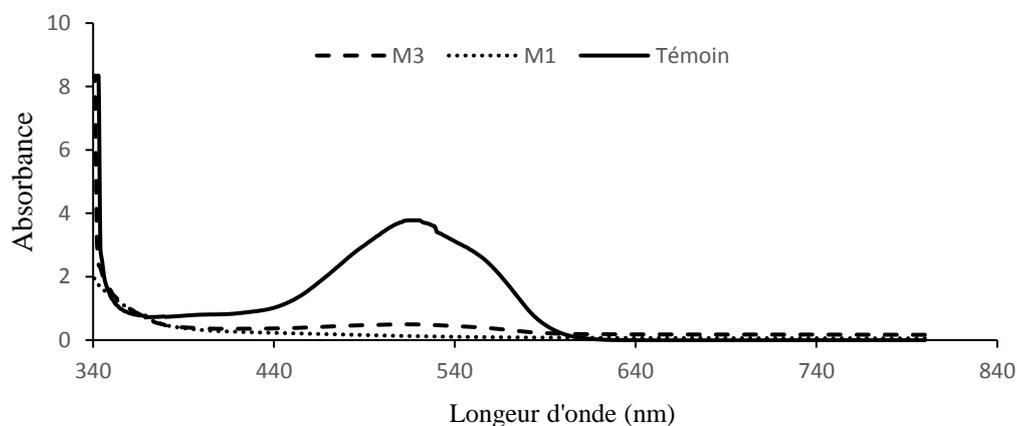


Figure 4 : Spectre de l'UV-vis du RC (50 mg/L) et ses produits de dégradation par M1 et M3 (24h, 150 rpm, 30°C)

D'après la figure 4 on note la disparition de la bande d'absorption maximale, caractéristique du groupe chromophore de RC, située à 515 nm aussi bien pour la souche M1 que pour la souche M3. Ceci confirme la dégradation totale du RC (50 mg/L) par les deux souches qui s'explique par le clivage du groupe chromophore caractérisé par la liaison N=N et qui absorbe dans cette région. Cependant, aucune nouvelle apparition de pics d'absorption n'a été marquée dans la plage de rayonnement visible 400-800 nm.

En effet, le mécanisme de biodégradation des colorants azoïques par les microorganismes implique des réactions enzymatiques responsables de la réduction ou de l'oxydation de ces composés entraînant la formation de sous-produits généralement incolores. Le clivage des groupes azoïques (N=N) est généralement considéré comme la première étape de la décoloration biologique des colorants azoïques catalysée par les azoréductases (Dos Santos et al., 2007). Il est fort probable que le colorant RC ait été d'abord transformé en amines correspondantes, qui sont l'acide 4-aminonaphtalène-1-sulfonique et l'acide 3-amino-4-hydroxynaphtalène-1-sulfonique, suivi d'un processus de désulfuration et de désamination pour aboutir au naphthol (Tan et al., 2013 ; Saratale et al., 2009 ; Xu et al., 2007).

Les cycles naphtalène absorbent dans la région UV à environ 320 nm (Abidin et al., 2015). Cette région est difficilement interprétable dans notre cas. Ceci peut être dû soit à une saturation à cause de la concentration élevée de ces groupements dans la solution soit à un dysfonctionnement de l'appareil. La présence de ces molécules pourrait être confirmée par les analyses ultérieures (IRTF et GC/MS).

He et al. (2004) ont également constaté qu'après 20h d'incubation, en présence d'un consortium microbien, la structure du colorant Direct Fast Scarlet 4BS a nettement changé et l'absorbance à 500 nm a complètement disparu. Cela a été expliqué par le clivage des liaisons azoïques formant, ainsi, un intermédiaire correspondant au phényle et naphthyle. Ces derniers sont reconnus par l'apparition de nouveaux pics situés à 250 et 310 nm respectivement.

2.2. Analyse des produits de dégradation

Dans le but de caractériser et identifier les produits de dégradation du RC par l'isolat M1 et M3. Ceux-ci ont été testés à l'aide de différentes méthodes.

2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les produits extraits par l'acétate d'éthyle ont été déposés sur une lame réservée aux analyses par la chromatographie sur couche mince. Les résultats obtenus sont montrés sur la figure 5.

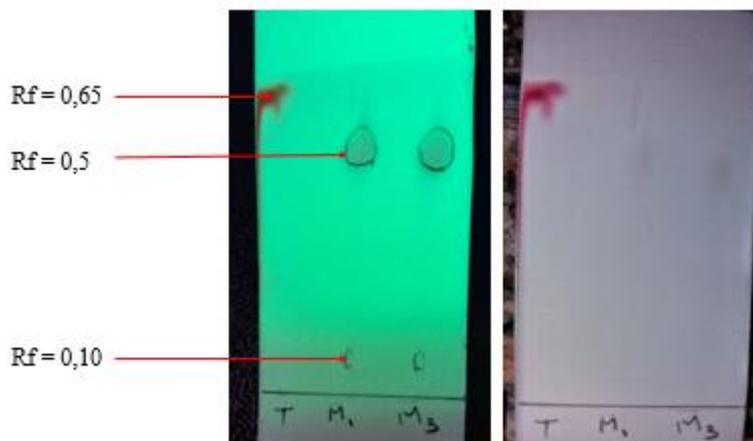


Figure 5 : résultats de la CCM obtenus pour les produits de la décoloration par M1 et M3 visualisés sous rayonnement UV (Gauche) ou sans UV (Droite)

D'après la figure 5, deux spots ont été révélés pour les deux souches. Le premier a un rapport frontal (Rf) de 0,10 et le deuxième a un Rf de 0,5. Tandis que le témoin a présenté un spot ayant un Rf de 0,65.

La chromatographie sur couche mince a séparé les métabolites en fonction de leur polarité et de leur affinité pour le gel de silice. Les composés les plus polaires interagissent plus fortement avec le gel de silice ce qui influence négativement leur mobilité. Ainsi, ils se situent à une partie inférieure de la plaque de CCM.

Nos résultats concordent avec ceux de Jadhav et al. (2007) et Vatandoostarani et al. (2015) qui ont porté sur la dégradation du rouge de méthyle (RM) par *saccharomyces cerevisiae*. La chromatographie sur couche mince (CCM) a confirmé la dégradation du RM en deux métabolites, la N, N-diméthylphénylènediamine (DMPD) et l'acide 2-aminobenzoïque (2-ABA) ayant des rapports frontaux différents.

2.3. Mesure de l'activité enzymatique de la laccase

Afin d'élucider les mécanismes mis en jeu par les deux souches de levures pour la décoloration du (RC), il était intéressant d'étudier les enzymes impliqués dans ce processus. De

ce fait, un test de mesure de l'activité de laccase a été effectué pour M1 et M3 additionnés ou non de 25 mg/L de RC. Les résultats de ce test sont présentés sur le tableau 7.

Tableau 7 -Activité laccase pour les souches M1 et M3, en présence ou en absence de RC (25 mg/L)

Traitements	M1	M1+RC	M3	M3+RC
Activité mesurée (U/ mL)	$5,81.10^{-4}$	$22,4.10^{-4}$	$4,9.10^{-4}$	$5,81.10^{-4}$

D'après ces résultats, on remarque que l'activité laccase pour les deux souches est comparable lorsque leur croissance s'est effectuée dans un milieu en absence du colorant RC. Cette activité augmente de 74 % et 15 %, respectivement pour M1 et M3 suite à l'ajout de RC dans le milieu.

On remarque que le taux de stimulation de laccase est assez faible pour M3, bien que cette souche se soit montrée performante dans la décoloration du RC, ceci suggère la mise en jeu d'autres enzymes.

Des résultats similaires ont été rapportés ; une augmentation significative des activités de NADH-DCIP réductase et azoreductase dans les cellules de *Trichosporon begelii* et *Galactomyces geotrichum* après l'ajout du colorant a été signalée (Saratale et al., 2009 ; Waghmode et al., 2012).

En outre, plusieurs études ont révélé que l'activité enzymatique est stimulée par la présence des colorants. L'activité laccase est améliorée chez *Pleurotus sajorcaju* en présence de Acid Blue 80, Acid Green 28 et Reactive Red 198 (Munari et al., 2008) et chez *Galactomyces geotrichum* par un mélange de Remazol Red, de Golden Yellow HER, de Rubine GFL, de Scarlet RR, de Rouge de Méthyle, de Brown 3 REL et bleu brillant (Waghmode et al., 2011).

Il a également été observé que plusieurs enzymes peuvent être induites au cours du processus de décoloration. Des études ont montré que la production de laccase, manganèse peroxydase et lignine peroxydase par *Trametes pubescence* est stimulée lors de la présence de Reactive Blue 49 (Casieri et al., 2008). La manganèse peroxydase et la tyrosinase chez *Williopsis californica*, *Williopsis saturnus*, *Candida* sp. et *Trichosporon porosum* sont induites en présence du réactif Black 5 (Martorell et al., 2012).

3. Etude de le biosorption

Récemment, un certain nombre d'études ont porté sur des biomatériaux capables de biodégrader et de biosorber les colorants dans les eaux usées. Cependant, ces adsorbants à faible coût ont généralement de faibles capacités d'adsorption. Par conséquent, il est nécessaire de trouver de nouveaux adsorbants, économiques, facilement disponibles et très efficaces. En effet, la biosorption des colorants textiles a été observée lors de l'utilisation de la biomasse dérivée de certaines levures par exemple, *Kluyveromyces marxianus* IMB3 (Meehan et al., 2000). C'est dans cette optique que cette étude a été menée sur M1 et M3 en utilisant comme colorant le rouge de carmoisine (RC).

3.1. Décoloration du RC par les cellules mortes

Dans le but de comprendre les mécanismes d'interactions des levures vis-à-vis du RC, le test suivant a été réalisé, qui consiste à comparer la capacité d'élimination du RC des cellules vivantes et mortes. Pour ce faire 2 g/L de biomasse pour chaque type de cellules a été mis en contact avec 50mg/L de RC. La figure 6 présente les résultats obtenus.

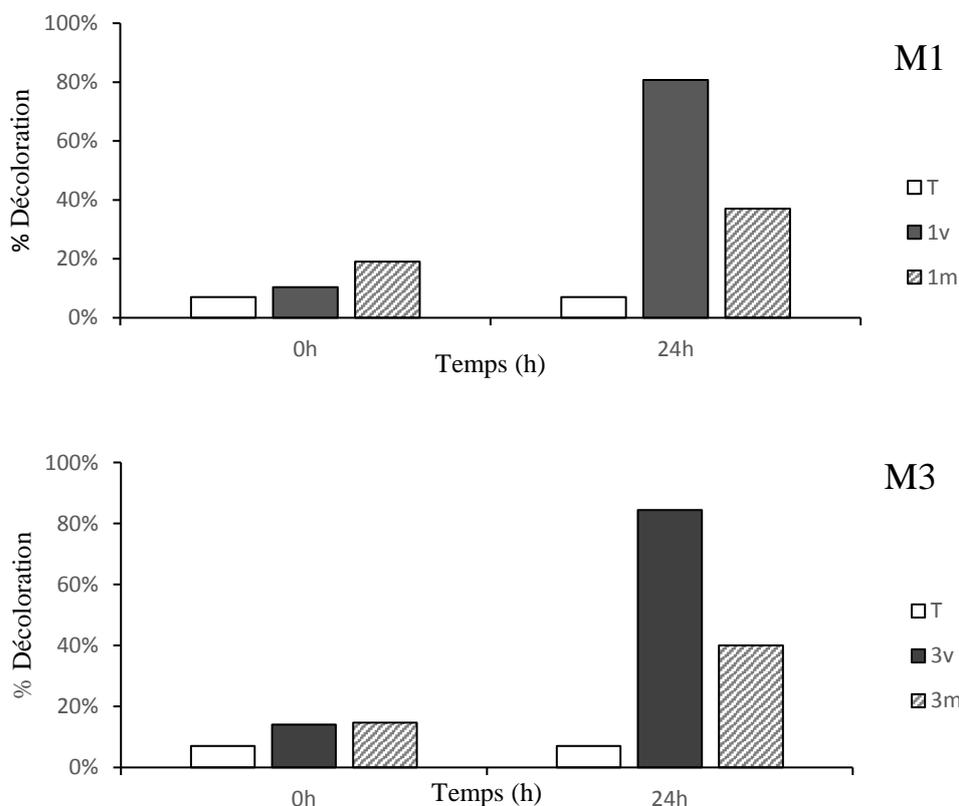


Figure 6 : Décoloration du RC (50 mg/L) par les cellules de M1 et M3 vivantes (v) ou mortes (m) à 30°C et 150 rpm

D'après les résultats trouvés, on remarque que la capacité d'élimination du RC par les cellules mortes est faible par rapport à celle des cellules vivantes. Les taux d'élimination obtenus sont de l'ordre de 80,7 % et 30 %, respectivement pour la souche M1 vivante et morte et de 84,3 %, 39,9 %, respectivement pour la souche M3 vivante et morte.

La diminution remarquée dans le taux de décoloration pour les cellules inactives mortes peut être expliquée par l'inhibition de leurs activités métaboliques causée par le traitement thermique. Seyis et al. (2008) ont testé la capacité de 16 différentes souches de champignons sur la décoloration du méthyle orange. Pour l'ensemble des souches, les cellules vivantes ont été montrées avantageuses en présentant un taux de décoloration élevé par rapport aux cellules autoclavées.

Selon Dönmez (2002), les levures peuvent éliminer les colorants en utilisant le mécanisme de la biosorption. Ce mécanisme consiste à une adsorption physique à la périphérie de la cellule, suivie d'une accumulation spécifique dans la paroi et à l'intérieur de la cellule.

L'utilisation des cellules mortes constitue un alternatif apprécié de point de vue économique. En effet, les cellules mortes peuvent être stockées ou utilisées pendant de longues périodes à des températures ambiantes. Elles ne sont pas affectées par la toxicité des colorants. De plus, l'approvisionnement en éléments nutritifs n'est pas nécessaire (Dhankhar et Hooda, 2011).

Des recherches ont montré que certains procédés de prétraitement peuvent augmenter la capacité d'adsorption des colorants par la biomasse, comprennent l'autoclavage ou le traitement de la biomasse avec des produits chimiques organiques tels que le formaldéhyde ou des produits chimiques inorganiques tels que NaOH, H₂SO₄, NaHCO₃ et CaCl₂ (Fu et Viraraghavan, 2000).

3.2. Caractérisation de l'adsorbant par IRTF

Afin d'étudier les caractéristiques chimiques des différents groupements cellulaire impliqués dans l'adsorption du RC par les souches de levures M1 et M3, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier IRTF a été utilisée (figure 7). Deux types de vibrations sont considérés : la vibration de valence ou d'élongation (stretching) et la vibration de déformation (bending).

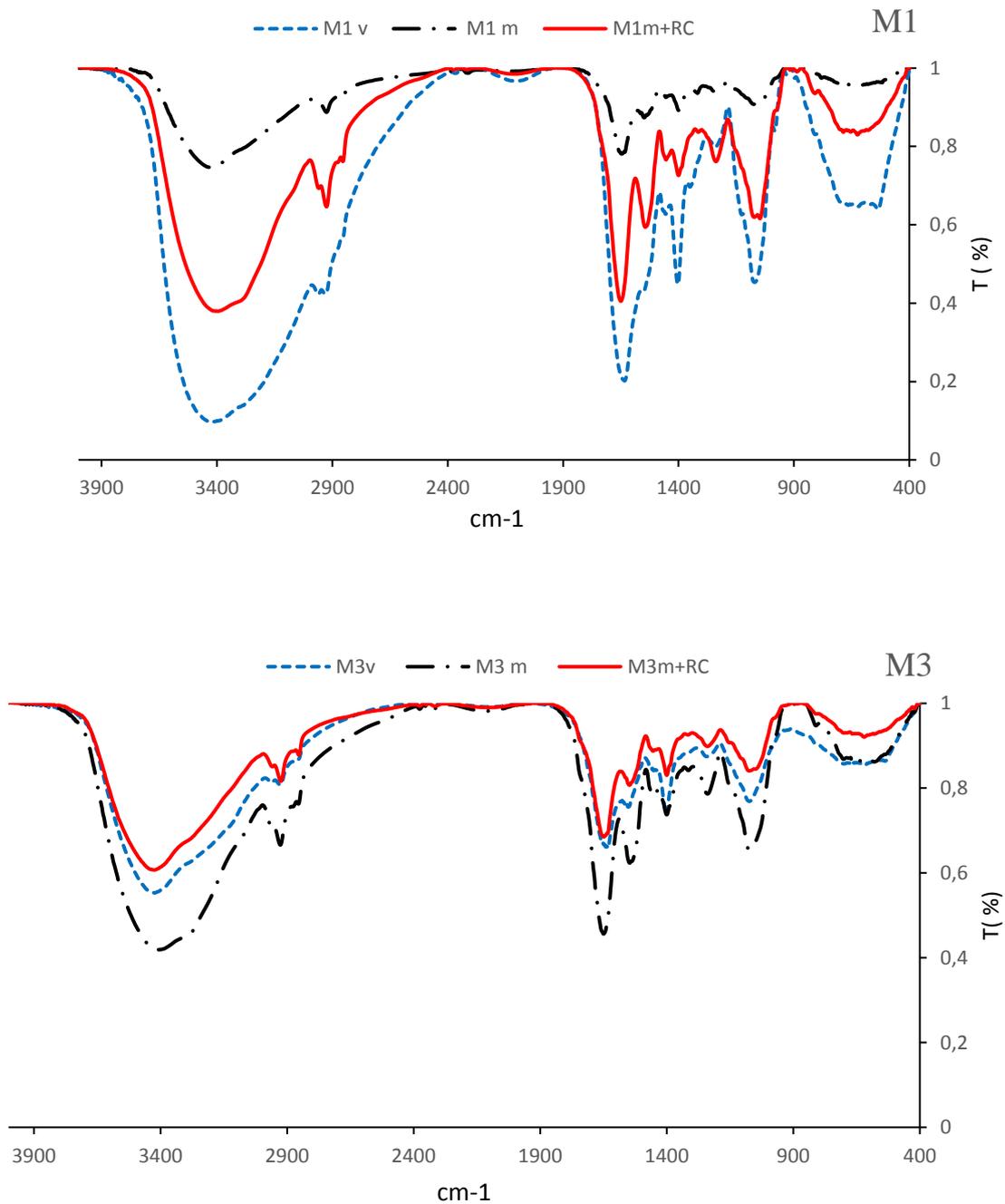


Figure 7: Spectre IRTF des cellules de levures M1 et M3 : vivantes (v), mortes (m) et mortes additionnées de RC (25 mg/L)

Les spectres montrent différentes bandes d'absorption désignant ainsi une structure complexe de la paroi des cellules de levures étudiées. Les principales bandes d'adsorption détectés sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8 -les pics enregistrés et leur correspondance selon la littérature

Bandes (cm ⁻¹)	Correspondances selon la littérature	Référence
3200-3570	- Groupement hydroxyle, vibration d'élongation -OH lié	- (Evora et al., 2002) - (Silvestein et al., 1979)
3375-3400	- Amines primaires -NH ₂ , vibration d'élongation (protéines)	
2921	- Elongation asymétrique du groupement fonctionnel CH ₂ , (lipides)	- (Ramao et al., 2003)
2853- 2858	- Elongation symétrique du groupement aliphatique CH ₂	- (Ramao et al., 2003)
1638	- Vibration d'élongation (C=O) - Déformation axiale (C-N) - Déformation des amines primaires NH ₂	- (Farsani et al. 2009) ; - (Almeida 2008) ; - (Stuart 2004)
1552	- Élongation des liaisons (C=C) - Élongation (C-N) et déformation des amines secondaires (N-H)	- (Arjunan et al. 2004) ; - (Stuart 2004)
1408	- Groupements sulfoniques, déformation de OH des alcools tertiaires - Groupement carboxylate COO-	- (Barbosa, 2007) - (Das and Guha 2009).
1242-1244	- Vibration des liaisons (C-N) et (C=O) →Amides III	- (El-Kabbany et al. 2010) - (Dutra et al. 1995)
1000-1156	- Vibrations d'élongation des liaisons C-C, C-O, et C-N →Polysaccharides - Elongation S=O, 1060-1020 cm ⁻¹ - Groupement phosphates - Déformation δ C-H des cycles aromatiques →Acides nucléiques	- (Aliprandini2010 ; Devi et al. 2010) - (Stuart 2004) - (Quek et al., 2009). - Cherdoud-Chihani et al. 2003)
450-850	- Déformation angulaire hors plan (torsion) des liaisons N-H des amines secondaires - Liaisons H-C-C and C-C-C	- (Barbosa 2007) - (Cherdoud-Chihani et al. 2003)

Suite à cette analyse, on peut déduire que la membrane cellulaire est constituée spécialement de lipides témoins par l'apparition des vibrations dues aux liaisons -CH₂, de protéines ; justifiés par l'apparition des bandes caractéristiques des amides primaires secondaires et tertiaires. Ainsi que les polysaccharides et les acides nucléiques. Conformément à nos résultats, il a été rapporté dans la littérature que la paroi des levures est composée principalement de macromolécules suivantes : les carbohydrates (80 à 90 %), sous forme de polymères de glucane et mannane associées aux protéines, la chitine en quantité mineur (0,6 % à 9 %), les protéines (6 à 25 %) et les lipides (1 à 7 %) (Lagane, 2007 ; Mitter & Corso, 2013 ; Morilhat et al., 1977).

On remarque également, d'après la figure 7, que les souches ont réagi de manière différente au traitement thermique, par rapport aux cellules vivantes. L'absorbance a dramatiquement diminuée dans le cas de M1, et elle a légèrement augmenté pour M3, pour l'ensemble des pics.

D'après la littérature, la température peut avoir un effet à la fois positif ou négatif sur le phénomène de l'adsorption. En effet, la capacité d'adsorption testée sur la biomasse fongique augmente en augmentant la température, jusqu'à atteindre un seuil déterminé, ce qui est dû à l'activation de la surface et l'élévation de l'énergie des molécules de colorant (Bakshi et al., 2006 ; Kaushik et al., 2009). Cependant, celle-ci diminue lorsque les cellules sont soumises à une température très élevée ce qui est probablement dû à la désactivation de la surface ou à la destruction des sites actifs (Erden et al., 2011 ; Iqbal et al., 2007).

En outre, par rapport aux cellules vivantes, on remarque que l'ajout du RC a également entraîné une diminution de l'absorbance de la totalité des pics tels que les hydroxyles, les amides (I, II, et III), les carboxyles, les phosphates et les polysaccharides. Une diminution de l'intensité des bandes 3200-3570 cm⁻¹ et 3375-3400cm⁻¹ a été remarquée chez les deux souches, ce qui indique l'implication des groupements hydroxyles et amines dans l'adsorption du RC. Les pics autour de 1000-1156 représentant une variété de groupement, à savoir les polysaccharides, les phosphates, les sulfates et les acides nucléiques, diminuent également, ce qui prouve l'interaction de ces derniers avec le RC.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que les groupements fonctionnels déjà cités (amines, carboxyles, hydroxyles, phosphates, lipides) participent à l'adsorption du RC. Cette observation implique la liaison du RC surtout avec les protéines et les lipides.

Viraraghavan (2002) ont également étudié les rôles joués par des groupements fonctionnels carboxyle, amine, phosphate et lipide présentes dans la biomasse fongique de *A. niger* dans la biosorption de quatre colorants différents. Dans la biosorption de Basic Blue 9 sur *A. niger*, les groupes carboxyle et amines se sont révélés être des sites de liaison, tandis que dans la biosorption du Acid Blue 29, seul le groupe amines était le site majeur et l'attraction électrostatique était le mécanisme principal. Dans la biosorption du rouge Congo, les amines, les acides carboxyliques, les groupes phosphate et les fractions lipidiques se sont révélés être des sites de liaison importants. Dans la biosorption du rouge disperse 1, l'adsorption physique et chimique ainsi que l'attraction électrostatique se sont révélées être le mécanisme de la biosorption, tandis que les fractions amines et des lipides étaient les principaux sites de liaison.

Les changements dans les groupes fonctionnels et les propriétés de surface de *Phanerochaete chrysosporium* après autoclavage ont été confirmés par des spectres FTIR, il y avait des diminutions claires de l'intensité des pics de C-N-C à 540- 470 cm^{-1} , représentant un cisaillement dans la structure polypeptidique.

D'après Kim et al. (2015), les groupements fonctionnels potentiellement impliqués dans l'adsorption du colorant RO 16 comprennent les groupements phosphate, carboxyle, amine et amide. De même que, la capacité d'adsorption élevée est due à la forte interaction électrostatique entre le NH_3^+ de la levure de bière et les molécules de colorant anionique. En outre, Dilarri et al. (2016) ont remarqué qu'une augmentation du pH entraînait une diminution de la capacité d'adsorption maximale de la biomasse de levure

3.3.Adsorption du RC à différentes concentrations par M1 et M3

Afin de comparer la capacité d'adsorption des cellules mortes de M1 et M3, une étude des isothermes d'adsorption a été réalisée. L'expérience effectuée a mené aux résultats présentés sur la figure 8.

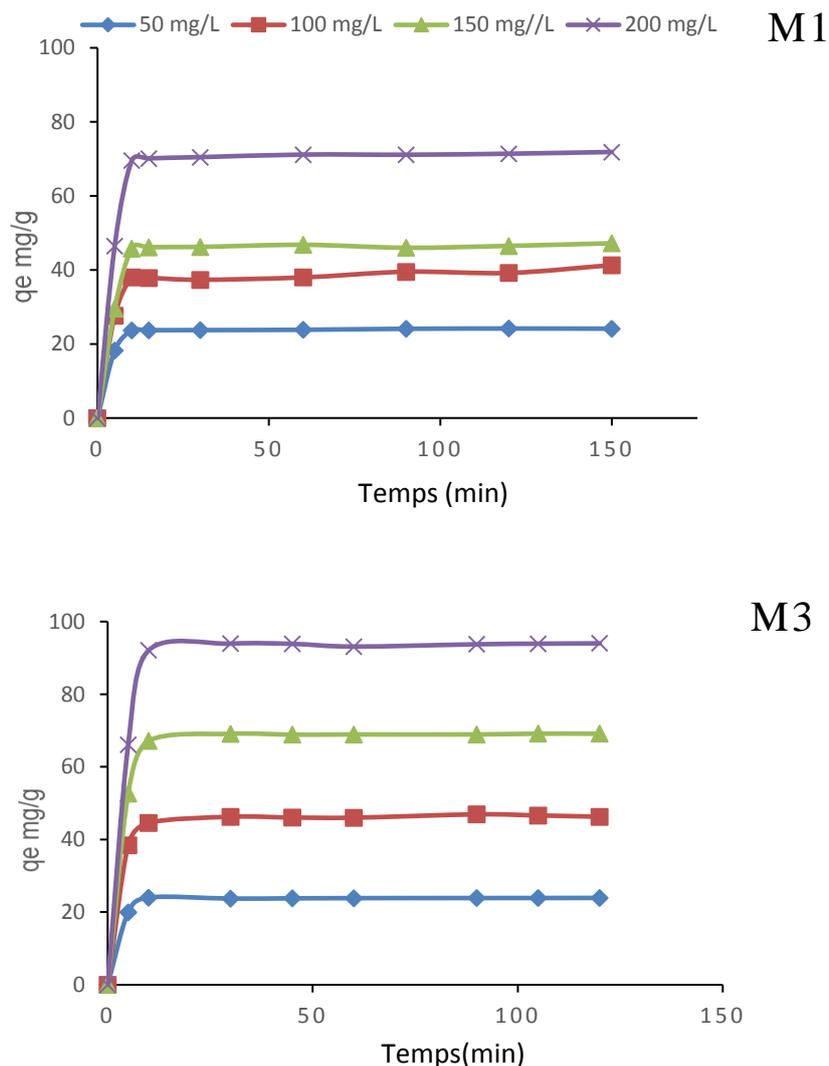


Figure 8 : Etude de l'équilibre de l'adsorption du RC en fonction du temps par les levures M1 et M3

La figure 8 représente la variation de la capacité d'adsorption (Q_t) du RC à différentes concentrations (50 à 200 mg/L) en fonction du temps de contact avec les cellules de levure M1 et M3 (mortes). D'après les résultats obtenus, on remarque le processus de l'adsorption se déroule dans un temps très court avant d'atteindre l'équilibre. La vitesse d'adsorption du RC est importante dans les premières minutes pour les différentes concentrations. Après 20 min de contact un palier d'équilibre est observé. Ceci peut être expliqué par une saturation des sites impliqués dans l'adsorption du colorant. En effet, dans les premières minutes de contact, les sites d'adsorption sont libres, et donc facilement accessibles aux colorant, d'où un taux d'adsorption très élevé par les cellules. Toutefois, après la période initiale (15min), l'adsorption diminue. Ceci serait dû à la diminution des sites d'adsorption disponibles à la fin du processus

d'adsorption et/ou à la difficulté des molécules adsorbées à pénétrer dans l'adsorbant et par conséquent une saturation de celui-ci est marquée à ce niveau.

On remarque également que la capacité d'adsorption des deux souches dépend fortement de la concentration initiale du colorant. En effet, la capacité maximale d'adsorption du colorant par la biomasse augmente en augmentant la concentration du RC dans le milieu indiquant la bonne efficacité des souches utilisées. En outre, la capacité d'adsorption de la souche M3 est supérieure à celle de la souche M1. Celle-ci est de 24,1 mg/g, 41,2, 47,2, et 71,8 pour la souche M1 et de 23,9, 46,2, 69,1 et 94,0 pour la souche M3, respectivement en présence de 50mg/L, 100mg/L, 150 mg/L et 200 mg/L du colorant. Ce qui est tout à fait en accord avec les résultats obtenus précédemment.

Des résultats similaires ont été obtenus pour le colorant Acid black1 adsorbé sur la biomasse dérivée des algues marines *S. glaucescens* et *S. marginatum*. L'adsorption a rapidement augmenté pendant les 10 premières minutes et a atteint l'équilibre au bout de 90 min (Daneshvar et al., 2012). D'autres études ont abouti à des résultats semblables en utilisant une variété de colorants et de micro-organismes (Mokhtar et al., 2017 ; Nguyen et al., 2016 ; Yu et al., 2009)

Cette différence de vitesse a été expliquée par le fait que la phase initiale peut impliquer une adsorption physique ou un échange d'ions à la surface cellulaire, et la phase ultérieure plus lente peut impliquer d'autres mécanismes tels que la complexation, la micro-précipitation ou la saturation des sites de liaison (Gupta & Rastogi, 2009).

3.4.Modèles isothermes d'adsorption

La modélisation des équilibres d'adsorption consiste à représenter, par des lois mathématiques, la relation à l'équilibre entre la quantité de polluant en phase liquide (C_e) et celle adsorbée sur le matériau (Q_e). Dans cette étude, l'équilibre d'adsorption est analysé par application de deux modèles, Langmuir et Freundlich, afin de modéliser le comportement de l'adsorption et d'évaluer les performances des deux souches de levures dans l'élimination du RC. Ces derniers sont couramment utilisés par les chercheurs pour l'étude des isothermes d'adsorption des systèmes adsorbant/adsorbat (Zhang et al., 2013 ; Moussavi et al., 2011).

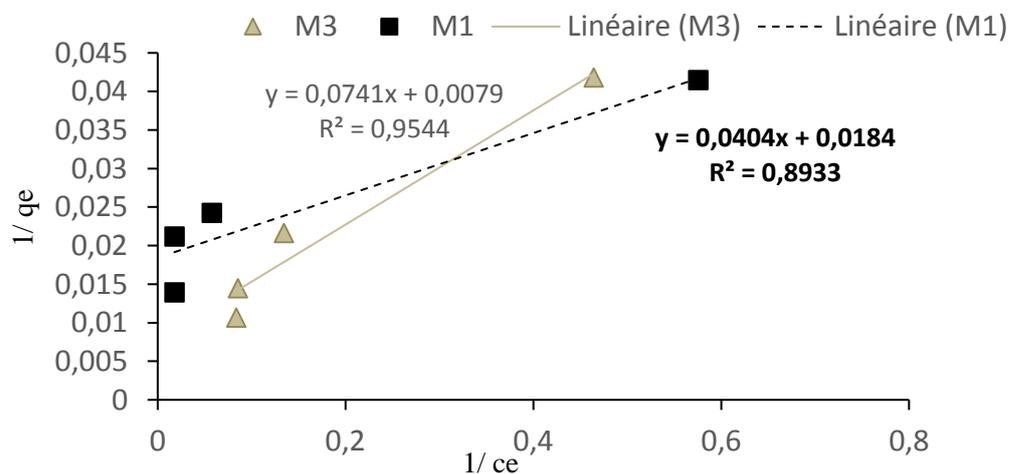
Les paramètres de Langmuir (K_{L} et Q_{max}) et de Freundlich (K_f et $1/n$), obtenus par linéarisation des équations des deux modèles ainsi que les coefficients de corrélation sont reportés dans le tableau 9.

Tableau 9 - Paramètres et facteurs de corrélation des modèles des isothermes d'adsorption du RC par les souches de levure M1 et M3

Paramètres des modèles	Langmuir			Freundlich		
	$Q_{\max}(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$K_L(\text{L} \cdot \text{mg}^{-1})$	R^2	1/n	K_f	R^2
M1	54,34	0,45	0,8933	0,3 (bonne)	20,715	0,8532
M3	126,58	0,107	0,9544	0,5 (modérée)	15,87	0,849

Tableau 10 - Variation de l'intensité d'adsorption (R_L) en fonction de la concentration initiale du RC dans le milieu ($C_0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Adsorbants	$C_0(\text{mg/L})$			
	50	100	150	200
M1	0,04	0,02	0,01	0,01
M3	0,15	0,08	0,05	0,04

**Figure 9: Isothermes d'adsorption de Langmuir du RC par les souches M1 et M3 (2g/L)**

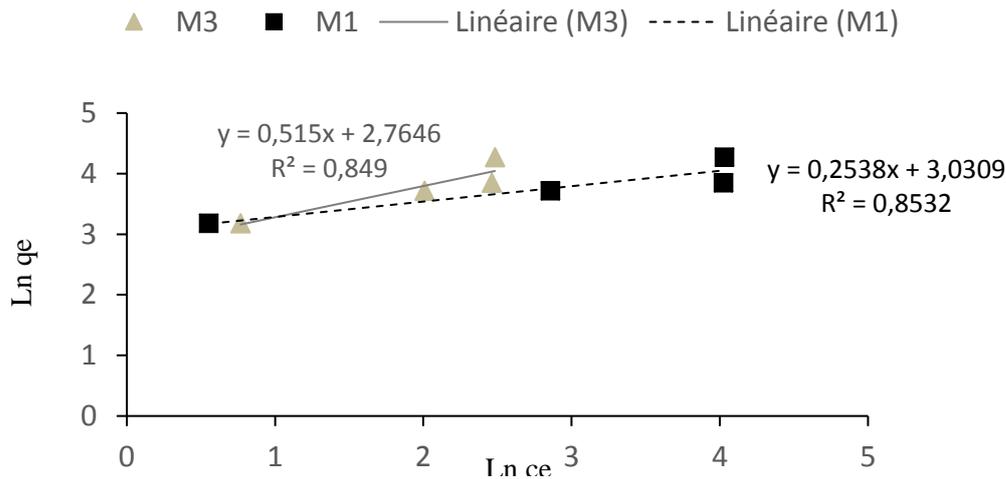


Figure 10: Isothermes d'adsorption de Freundlich du RC par les souches M1 et M3 (2g/L)

D'après la représentation graphique de chaque isotherme (figure 9 et 10) et le tableau 9, les isothermes d'adsorption du RC par les deux souches sont mieux décrites par le modèle de Langmuir que par celui de Freundlich en présentant les facteurs de corrélation les plus élevés (R^2 Langmuir M1 (**0,8933**) et M3 (**0,9544**) $>$ R^2 Freundlich M1 (0,8532), M3 (0,849)). Ceci suggère que l'adsorption de RC par les deux souches étudiées se fait sur une surface limitée présentant des sites d'adsorption homogènes.

En effet, d'après la théorie de Langmuir, tous les sites actifs sont identiques et l'adsorbant présentent une capacité d'adsorption limitée (Q_{\max}), par conséquent, celui-ci ne peut complexer qu'une seule molécule de soluté (adsorption monocouche) avec l'absence d'interactions entre les molécules adsorbées (Langmuir, 1918). Toutefois, le modèle de Freundlich suppose que le cas d'une formation de plus d'une monocouche d'adsorption sur la surface peut être possible et les sites sont hétérogènes avec des énergies de fixation différentes.

L'utilisation de la droite de régression linéaire nous a permis de déterminer la capacité d'adsorption maximale Q_{\max} et la constante d'équilibre d'adsorption de Langmuir K_L .

En effet, la souche M3 a montré une capacité d'adsorption maximale de l'ordre de 126,58 mg de colorant sur gramme de biomasse, alors que celle de M1 est de 54,34 mg/g. les constantes d'équilibre d'adsorption de Langmuir sont 0,45 L/mg et 0,107 L/mg respectivement pour M1 et M3.

Par ailleurs, on note, que tous les coefficients R_L de ce modèle tendent vers 0 (tableau 10), ce qui confirme que l'adsorption est favorable par les deux souches (Sidirax et al., 2011).

La linéarisation des isothermes d'adsorption par le modèle de Freundlich génère deux paramètres : K_f et n . Bien que ces paramètres soient empiriques, K_f est généralement associé à la capacité d'adsorption, tandis que n est considéré comme une mesure du degré d'hétérogénéité des sites d'adsorption. Plus la valeur de $1/n$ est faible ($n > 1$), plus l'hétérogénéité des sites est grande (Xing et Pignatello, 1997). D'après les résultats montrés sur le tableau, les valeurs de $1/n$ sont inférieures à l'unité, exprimant ainsi que l'adsorption est favorable pour les deux souches.

Des résultats comparables ont été obtenus par Baocheng et al. (2007) qui ont mené une étude de l'adsorption du RC sur différents types de sols et dont la capacité maximale d'adsorption de ces matériaux a abouti à des valeurs comprises entre 0,83 mg/g et 1,83 mg/g, ce qui est largement inférieur aux capacités d'adsorption des deux souches testées dans cette étude. Les résultats expérimentaux indiquent que le modèle de Freundlich et celui de la cinétique de pseudo-deuxième ordre expriment mieux ce processus. De plus, ils ont constaté que la diminution du pH ou l'augmentation de la salinité peut améliorer l'adsorption du RC.

Dil et al. (2017) ont également testé la capacité d'adsorption du Crystal Violet (CV) et du vert brillant (VB) sur les cellules de *Yarrowia lipolytica* 70562 selon différents modèles. Ils ont indiqué que le modèle de Langmuir avait le coefficient de corrélation maximal (0,99) et Q_{max} était de l'ordre de 65,359 mg/g et 56,497 mg/g, respectivement pour VB et CV. La comparaison de la capacité d'adsorption maximale de notre étude et celles des autres travaux est présentée sur le tableau 11 qui montre que les résultats obtenus par cette étude sont très satisfaisants particulièrement pour la souche M3.

Tableau 11- Comparaison de Q_{max} et K_L de Langmuir entre différents biosorbants

Biosorbant	Q_{max} (mg/g)	Affinité (L/mg)	Référence
M1	54,34	0,45	Cette étude
M3	126,58	0,107	
<i>Salvia mitiorrhiza</i> Bge.	100	1	(Zhao et al., 2016)
<i>Posidonia oceanica</i>	147, 154 and 156	0,047 ; 0,049 ; 0,06	(Ncibi et al., 2014)
Paille de céréales	20,3 ; 25,3 et 26,3	0,218 ; 0,153 ; 0,176	(Han et al., 2006)
Noyau d'olive	13,20	0,115	(Albadarin&Mangwand, 2015)

3.5. Etude cinétique

Afin d'examiner l'influence du temps de contact sur la rétention du colorant par l'adsorbant, deux modèles ont été appliqués (le pseudo-premier ordre (eq.1) et le pseudo-second ordre (eq.2)) pour décrire la cinétique d'adsorption du RC par les cellules de levures M1 et M3 en fonction du temps.

$$\text{Log}(q_e - q_t) = \log(q_e) - K_1 \cdot t / 2.303 \quad (\text{eq.1})$$

$$t/q_t = (1/q_e) \cdot t + 1/(K_2 \cdot q_e^2) \quad (\text{eq.2})$$

Les résultats de l'application des modèles pseudo-premier ordre et pseudo-second ordre relatifs à l'adsorption du colorant RC par les cellules de levure M1 et M3 sont présentés dans les figures 11 et 12. Les valeurs des quantités adsorbées Q_e (mg/g), les coefficients de régression R^2 , les constantes de pseudo-premier ordre (K_1), et de pseudo-second ordre (K_2) sont données sur le tableau 12.

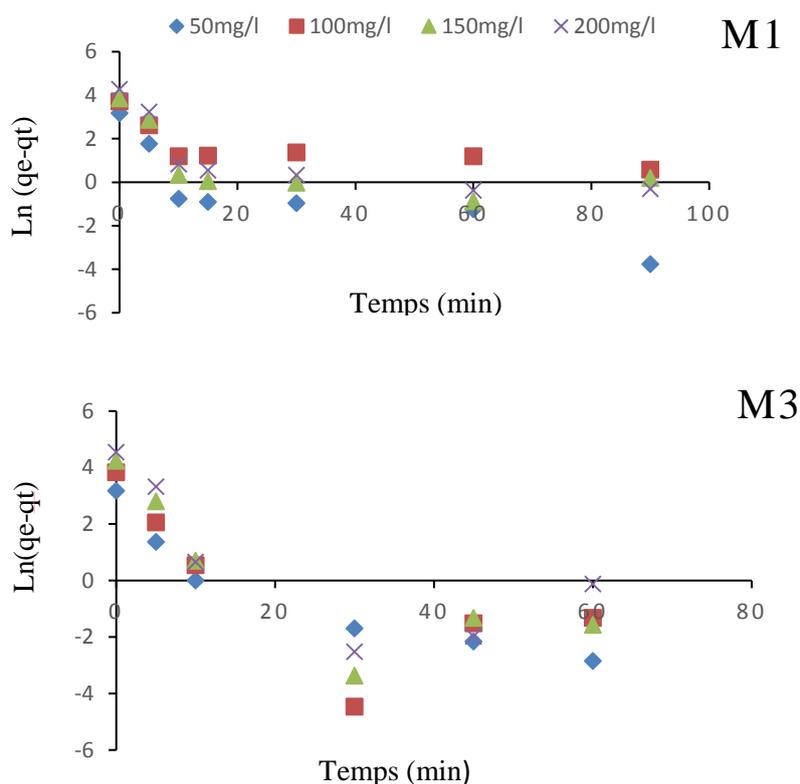


Figure 11 : Modèle de la cinétique « pseudo-premier ordre » appliqué à l'adsorption du RC par les cellules de levure M1 et M3

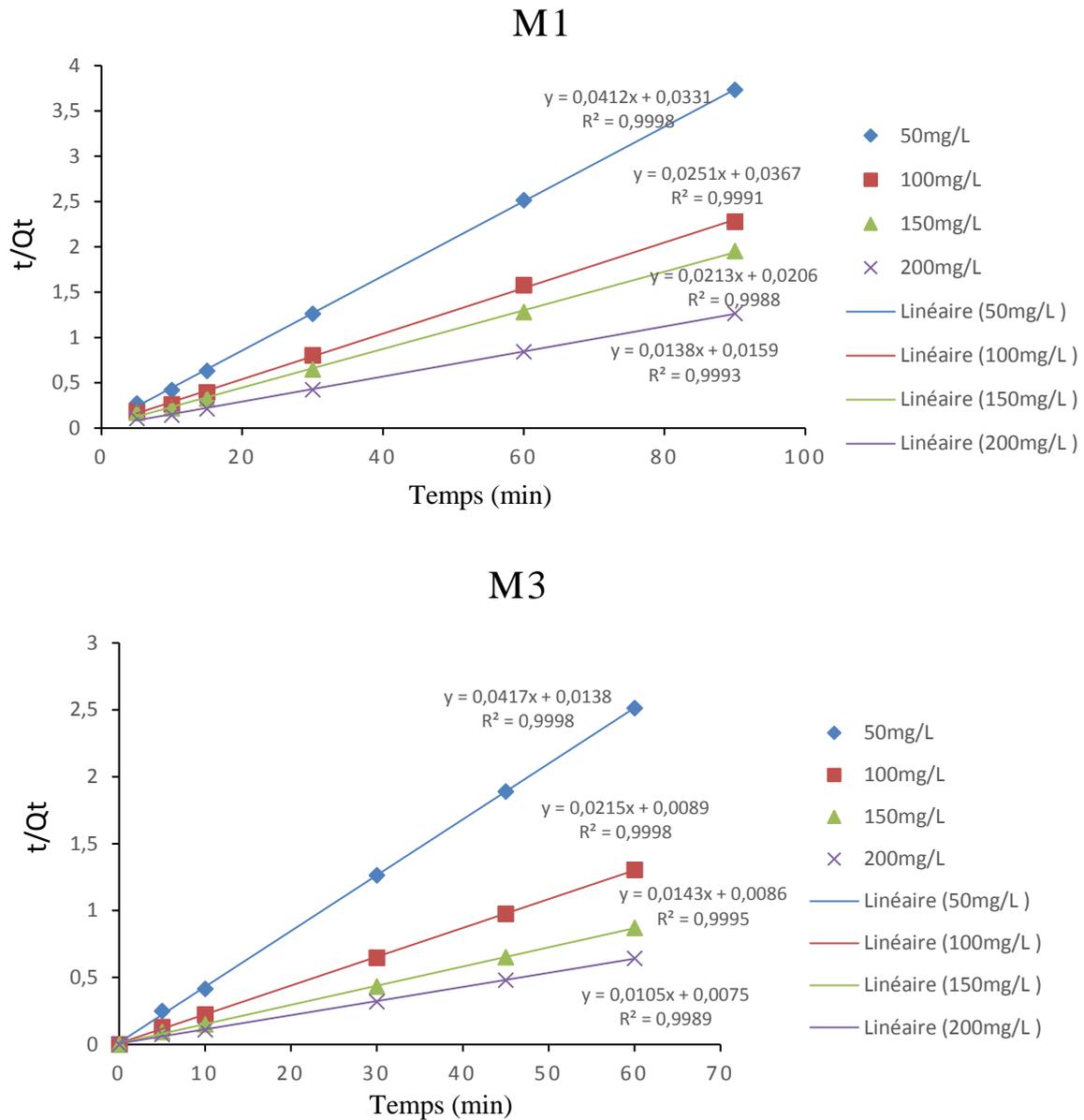


Figure 12 : Modèle de la cinétique « pseudo-second-ordre » appliqué à l'adsorption du RC par les levures M1 et M3

Tableau 12- Paramètres cinétique de l'adsorption du RC sur la biomasse de levure M1 et M3

	<i>Paramètres cinétiques</i>	<i>Concentrations initiales du colorant</i>			
		50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L
M1	<i>Pseudo premier ordre</i>				
	K₁(min⁻¹)	0,1296	0,0515	0,0725	0,0911
	R²	0,6964	0,4752	0,3646	0,5311
	<i>Pseudo second ordre</i>				
	K₂ (g.mg⁻¹.min⁻¹)	0,0512	0,0171	0,0220	0,0119
	R²	0,9998	0,9991	0,9988	0,9993
	Qe théorique	24,27	39,84	46,94	72,46
M3	<i>Pseudo premier ordre</i>				
	K₁(min⁻¹)	0,2051	0,1939	0,2151	0,1955
	R²	0,857	0,4776	0,6097	0,5247
	<i>Pseudo second ordre</i>				
	K₂ (g.mg⁻¹.min⁻¹)	0,1260	0,0519	0,0229	0,0147
	R²	0,9998	0,9998	0,9995	0,9989
	Qe	23,98	46,51	69,93	95,23

D'après la figure 11 et le tableau 12, les valeurs de R^2 ont été trouvées relativement faibles et comprises entre 0,3646 et 0,6964 pour M1 et entre 0,4776 et 0,857 pour M3 en appliquant l'équation de Lagergren. Ainsi, le modèle pseudo-premier ordre est inapplicable dans l'étude de l'adsorption du RC par les deux souches de levures.

Toutefois, le tracé linéaire (t/Q_t) en fonction du temps (t) (figure 12), donne une ligne droite dans le cas des deux souches en appliquant le modèle pseudo-second ordre. Ceci indique

que le processus d'adsorption suit parfaitement la variation linéaire donnée par l'équation représentative du modèle pseudo-second ordre. Par conséquent, les valeurs de coefficients de régression (R^2) de ce modèle étaient très élevées (toutes de l'ordre de 0,99) dépassant de loin celles obtenues avec le modèle du pseudo-premier ordre. Ainsi, la cinétique de l'adsorption est très bien décrite par le modèle du pseudo-second ordre par rapport au modèle du pseudo-premier ordre, suggérant ainsi une chimisorption (Mokhtar et al., 2017), la capacité de biosorption (q_e) du modèle concordait bien avec le (q_e) expérimental.

3.6. Diffusion intraparticulaire

Afin déterminer le mécanisme de diffusion et de confirmer les résultats précédents obtenus par les isothermes d'adsorption, les résultats cinétiques ($Q_t = f(t)$), ont ensuite été analysés en utilisant le modèle de diffusion intra-particulaire. Selon Webber et Morris (Senturk et al., 2010), l'expression cinétique de diffusion intra-particulaire est souvent présentée par l'équation suivante : $Q_t = K_i \cdot t^{0.5} + C$

K_i ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{0.5}$) est la constante de vitesse de diffusion intraparticulaire. et C ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) : la valeur de l'ordonnée à l'origine qui donne une indication sur l'épaisseur de la couche limite. Les résultats de l'application de ce modèle sont présentés sur la figure 13.

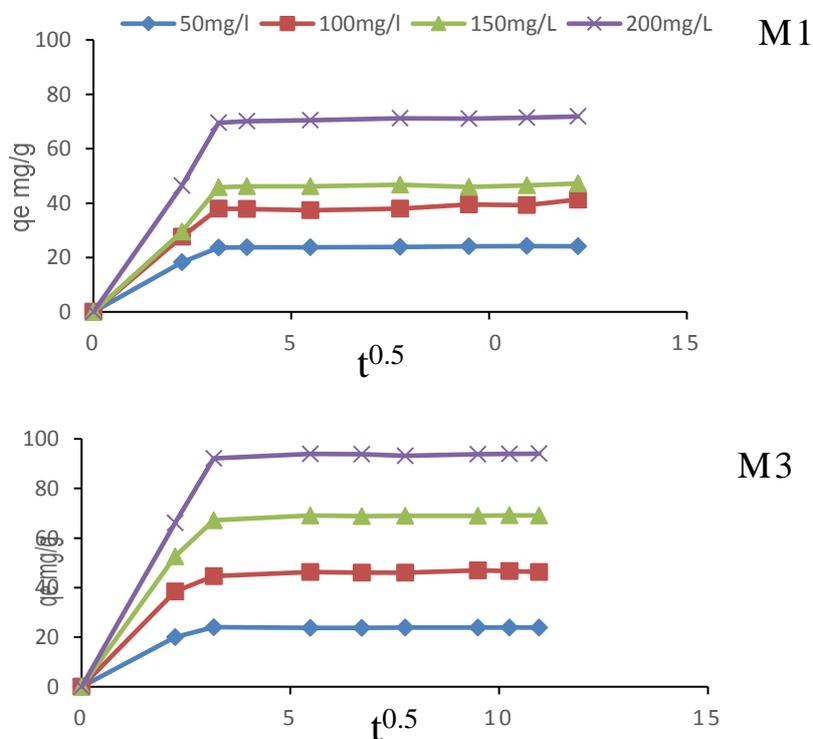


Figure 13 : Représentation de la diffusion intraparticulaire pour l'adsorption du RC par les souches M1 et M3

Le tracé de Q_t en fonction $t^{0.5}$ illustré sur la figure 13, qui donne deux phases pour chaque concentration étudiée. La première phase (linéaire) représente l'étape d'adsorption instantanée ou adsorption sur la surface externe. La seconde portion représente l'étape d'adsorption progressive ou diffusion intraparticulaire qui représente l'étape limitante du mécanisme d'adsorption. Les paramètres de ce modèle K_i ($\text{mg/g}\cdot\text{min}^{0.5}$) et C (mg/g) pour les deux linéarités sont représentés sur le tableau 13.

Tableau 13 -Paramètres du modèle de la diffusion intraparticulaire

	<i>Diffusion intraparticulaire</i>	Concentrations initiales du colorant			
		50mg/L	100 mg/L	150mg/L	200mg/L
M1	K_{i1}	7,6058	12,075	14,247	21,767
	C_1	0,2788	0,1445	-0,5274	-0,5059
	R_1^2	0,9953	0,9995	0,9957	0,9981
	K_{i2}	0,06	0,393	0,083	0,1898
	C_2	23,457	35,607	45,787	69,45
	R_2^2	0,8892	0,7625	0,3507	0,9464
M3	K_{i1}	0,1253	14,66	21,65	29,19
	C_1	-0,0385	1,277	0,9552	0,1794
	R_1^2	0,9832	0,9742	0,9932	0,9999
	K_{i2}	0,03	0,0835	0,022	0,0287
	C_2	23,59	45,657	68,835	93,527
	R_2^2	0,9206	0,2542	0,1487	0,0353

D'après les résultats présentés sur le tableau 13, on remarque, d'une part, que la constante de vitesse de diffusion (K_{i1}), pour l'ensemble des concentrations testé et pour les deux souches, dans la première étape est plus élevée que dans la seconde étape (K_{i2}). D'autre part, la vitesse d'adsorption(K_{i1}) augmente avec l'augmentation de la concentration du RC dans le milieu. Ceci est expliqué par le faite que le colorant RC est d'abord adsorbé par la surface externe. Une fois que la surface externe est complètement saturée, la molécule de colorant diffuse dans les pores

internes au sein des particules, et est finalement adsorbée par la surface interne de l'adsorbant (Fayoud et al., 2015). Les résultats obtenus par cette étude sont tout à fait en accord avec les résultats obtenus précédemment en appliquant les deux modèles Freundlich et Langmuir.

3.7. Criblage des facteurs influençant la biosorption

Il est essentiel de comprendre les effets des facteurs agissant sur le processus de décoloration, et de voir leur lien étroit avec l'amélioration de la décoloration. Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé par l'application de techniques statistiques des plans d'expérience pour rendre cette amélioration de plus en plus accessible. Ces méthodes réduisent l'expérimentation au nombre minimum d'expériences, permettent de cribler les facteurs des plus importants aux moins importants et permettent également d'optimiser les conditions opératoires pour obtenir le meilleur résultat possible.

3.7.1. Résultats expérimentaux

Dans le but d'examiner les facteurs affectant la biosorption du RC sur la biomasse de levure M1 et M3, une étude de criblage par des matrices de type Placket et Burman a été réalisée. Après un choix approprié de six facteurs, 12 expériences ont conduit à un modèle mathématique du premier degré reliant la fonction de réponse (%Décoloration) aux facteurs (pH, biomasse, température, concentration du colorant et agitation). Les valeurs des réponses observées avec différentes combinaisons des cinq variables étudiées sont répertoriées dans le tableau 14.

Tableau 14- Résultats du plan d'expérimentation

N°Ex	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
%Décoloration	M3	6,82	5,36	42,03	16,95	8,27	22,17	91,36	0	12,73	22,11	13,1	85,73

3.7.2. Etude des effets des facteurs

L'effet de facteurs étudié sur la réponse (taux de décoloration) a été étudié en utilisant la procédure de conception d'analyse du logiciel NemrodW. Les valeurs calculées sont répertoriées dans le tableau 15.

Tableau 15- Estimation des effets des facteurs du plan de Plackett et Burman (M3)

Nom	Coefficient	Ecart- Type(σ_b)	t. exp. = $\frac{b_j}{\sigma_b}$	Signif. %
b0	27,219167	8,4540243	3,22	1,81 *
b1	0,45416667	8,4540243	0,05	95,9
b2	-16,5575	8,4540243	-1,96	9,8
b3	-9,9525	8,4540243	-1,18	28,4
b4	-6,6891667	8,4540243	-0,79	45,9
b5	-3,5758333	8,4540243	-0,42	68,7

t.exp exprime la valeur expérimentale du rapport de Student. En général, plus la grandeur de t est élevée, plus p value est petit, et plus le terme correspondant de coefficient est significatif (Ravikumar et al., 2007). Les estimations des coefficients des monômes du premier degré traduisent les effets moyens des facteurs.

3.7.3. Analyse et interprétation des résultats

Les effets individuels de diverses variables peuvent être discutés à partir du diagramme de Pareto illustré par la figure 14. Un grand contraste d'un coefficient positif ou négatif indique qu'un facteur a un grand impact sur la réponse ; tandis qu'un coefficient proche de zéro signifie qu'un facteur a peu ou n'a pas d'effet (Levin et al., 2005).

Il est possible de décomposer la variation d'une réponse à partir des contributions apportées par chacun des facteurs dans un modèle à partir de la relation suivante :

$$CTR_j = \frac{a_j^2}{\sum_{j=1}^K a_j^2}$$

Avec :

CTR_j : la contribution du facteur j à la variation de la réponse.

a_j : le coefficient du modèle associé au facteur j ,

K : le nombre de facteurs de l'étude.

Les contributions des facteurs sont alors ordonnées par ordre croissant puis représentées sous forme de diagramme en bâtons associé à une représentation cumulative (figure 14)



Figure 14 : Les effets Pareto des coefficients de la réponse Y(M3)

La contribution de pH dans la réponse est la plus élevée (63,62 %), suivie par la biomasse (22,99 %), puis la concentration du colorant (10,38 %), l'agitation (2,97%) et la température (0,05 %). Toutefois, leurs coefficients ne sont pas significatifs selon le modèle utilisé.

Ainsi, le plan d'expérience de Plackett-Burmand à 12 essais a conduit à évaluer l'effet des conditions opératoires sur la décoloration. Dans cette étude, aucun paramètre n'a été identifié comme significativement influent dans le processus de décoloration. Ainsi le modèle utilisé n'est pas statistiquement valide ($R^2=0.50$), il conviendrait de tester un autre modèle.

Saraf et Vaidya (2015) ont évalué trois biosorbants issus de la biomasse fongique, à savoir les espèces de *A. niger*, *A. oryzae* et *R. arrhizus* pour leur potentiel à éliminer 13 colorants appartenant aux classes variées, y compris les colorants réactifs (orange réactif 13, bleu réactif 256, bleu réactif 222, noir réactif 5, rouge réactif 120, vert réactif 8), les colorants Remazol (orange réactif 16, violet réactif 5) et les colorants azoïques (acide rouge 151, Acid orange 7, bleu direct 9, bleu direct 199, bleu basique 9). L'effet du pH sur les capacités d'absorption spécifiques des biomasses a été étudié, une contribution significative du pH a été constatée.

4. Test de phytotoxicité

Les tests biologiques sont essentiels pour évaluer le succès du processus de biorestauration car ils permettent d'estimer la possibilité d'interaction des composés suspectés avec les organismes vivants (Mazzeo et al., 2010), contrairement aux analyses chimiques qui ne font que mesurer les concentrations des produits chimiques présents dans l'environnement.

La germination des graines et le test précoce de croissance ont été considérés comme l'une des méthodes les plus simples pour l'étude de la toxicité générale des produits chimiques et des eaux usées industrielles (Wang et Keturi, 1990).

Par conséquent, pour vérifier l'efficacité du processus de décoloration, l'évaluation de la toxicité du colorant a été effectuée avant et après la décoloration par les souches de levures sur des graines de luzerne. Le tableau 16 résume les résultats obtenus après 5 jours de culture à 30°C.

L'effet de la solution du colorant avant et après le traitement par les levures sur la croissance des graines a été également étudié en appliquant un test statistique (ANOVA) aux moyennes des longueurs de la partie aérienne et la partie racinaire de ces derniers. Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16- Effet des produits de dégradation sur la germination et la croissance de luzerne

Paramètres	Témoin (non traité)	Traité	
		M1	M3
Taux de germination	74,5 %	92,3 %	82,4 %
Longueur de la radicule (cm)	1,59±1,02	3,27±1,10	1,16±0,50
Longueur du coléoptile (cm)	3,55±1,53	5,32±1,00	4,4±1,01

D'après les résultats obtenus, une différence significative (ANOVA, $p < 0,05$) a été révélée entre les graines traitées par la solution du colorant traité avec les souches M1 et M3 et celles traitées par la solution non traitée, aussi bien au niveau du taux de germination qu'au niveau de la longueur de la partie racinaire et aérienne.

Les effets nocifs des colorants sur la germination des graines ont été rapportés par plusieurs auteurs. Parshetti et al. (2006) ont constaté qu'une solution de vert de malachite influence négativement le pourcentage de la germination des graines de *P. Mungo*. Toutefois, une amélioration dans la germination des graines a été marquée après le traitement biologique du colorant. De même, Saratale et al. (2009) indiquent que le taux de germination en présence d'une solution de bleu navy HER traitée par la souche *T.beigelii* est significativement

supérieure au témoin non traité. Des observations similaires ont été rapportées également pour le colorant rouge remazol (Waghmode et al., 2012), rouge HE3B (Kalyani et al., 2009) et rouge réactive2 (Phugare et al., 2011).

Ces résultats nous permettent de suggérer que les levures M1 et M3 présentent une bonne capacité détoxifiante vis à vis de RC. Des résultats similaires ont été obtenu par d'autres auteurs Mahmood et al. (2014) et Haq et al. (2018), qui ont montré que la décoloration de l'azure B par une souche de *S. liquefaciens* a diminué sa toxicité vis-à-vis des graines de *V. radiata*.

La réduction de la croissance des graines lors de leur exposition au colorant non traité peut être expliquée par la toxicité des colorants azoïques, ainsi, rapportée par plusieurs études. Il a été indiqué que les colorants azoïques Congo Red et Orange Réactive 16 provoquent une inhibition de la croissance des algues et affectent la luminescence bactérienne naturelle (Novotny et al., 2006). Des aberrations chromosomiques ont été également observée lorsque les bulbes d'*Allium cepa* ont été exposées à des colorants azoïques (Carita et Marin-Morales, 2008). De même, Jadhav et al. (2010) ont démontré que les colorants azoïques exercent des effets négatifs sur la division cellulaire d'*A. cepa*. Toutefois, le processus de décoloration est généralement surveillé en observant la concentration des contaminants ciblés. Néanmoins, la réduction de la contamination ne s'accompagne pas toujours d'une toxicité réduite (Eichlerova' et al., 2007). Une dégradation incomplète et la formation de métabolites intermédiaires peuvent entraîner une augmentation de la toxicité (Churchley et al., 2000).

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons eu à réaliser une étude qui avait pour objectif principal le traitement biologique des effluents liquides colorés et l'étude des mécanismes impliqués. Nous nous sommes intéressés particulièrement à l'étude de la décoloration d'un colorant azoïque, le rouge de carmoisine (RC), par deux souches de levures (M1 et M3), préalablement isolées à partir de sites pollués de la ville de Fès (Bahafid et al., 2013).

En premier lieu, nous avons pu mettre en évidence la capacité de décoloration de ces souches vis-à-vis d'une gamme de colorants azoïques, parmi lesquels le RC. Ce dernier a montré un taux de décoloration de 95,37 % et 96,05 %, respectivement pour M1 et M3, après 24 h d'incubation à 30 °C sous agitation de 150 rpm. Les cellules de levures immobilisées dans des billes d'alginate de sodium ou de carboxyméthylcellulose se sont également montrés capables de décolorer le RC avec des taux de 95,3 % (M1) et 85,4 % (M3) pour l'alginate de sodium et 82,9 % (M1) et 84,8 % (M3) dans le cas du CMC, après 24 h d'incubation.

Nous avons par la suite, essayé d'élucider les mécanismes impliqués dans ce processus de décoloration du RC. Nous avons d'abord procédé à une analyse par la spectroscopie UV-vis du milieu de culture après décoloration. Les résultats ont montré l'absence de la bande d'absorption maximale du RC ($\lambda=515$ nm), suggérant le clivage du chromophore (N=N). Les produits de dégradation ont été extraits par l'acétate d'éthyle en vue de leur caractérisation.

L'analyse par la chromatographie sur couche mince a révélé la présence de deux spots de rapport frontal différents, indiquant la présence probable de deux composés issus de la biodégradation du RC par M1 et M3.

L'activité enzymatique laccase dans le surnageant des cultures a été mesurée. A cette fin, l'oxydation de l'ABTS a été suivie à 420 nm pour les cellules cultivées en absence et en présence du RC. Les résultats ont montré une augmentation de l'activité enzymatique suite à l'ajout du colorant RC. Cette augmentation a été particulièrement importante dans le cas de M1 (74%), suggérant l'implication de cette enzyme dans la dégradation du RC. Alors que pour M3, il semble que la dégradation du RC ferait intervenir d'autres enzymes.

Le comportement des cellules de M1 et M3 mortes (traitées par autoclavage) a été également testé. Ces dernières contribueraient à la décoloration par le phénomène de l'adsorption. 39,9 % et 30 % étaient les taux de décoloration, respectivement par M3 et M1. Les résultats de l'analyse par IRTF ont permis de localiser les sites d'adsorption, dont les hydroxyles, carboxyles, phosphates et amines font partie.

La cinétique de l'adsorption a été réalisée, l'équilibre a été atteint rapidement et la capacité d'adsorption augmentait en fonction de la concentration du RC (50 à 200 mg/L). M3 a montré une capacité maximale d'adsorption (126,58 mg/g) supérieure à celle de M1 (54,34 mg/g). En outre, l'application de modèles cinétiques ont permis de constater que les réactions obéissent au modèle de deuxième ordre pour les deux souches suggérant une chimisorption.

L'étude des isothermes d'adsorption a montré que le modèle de Langmuir fournit une description satisfaisante pour l'adsorption du RC sur les cellules mortes de M1 et M3, de ce fait il s'agirait d'une adsorption monocouche sur des sites homogènes.

Le criblage des facteurs influençant l'adsorption a abouti à une classification des contributions de facteurs commençant par la pH, suivi par la biomasse, le colorant, l'agitation et la température. Pourtant le modèle doit être revu.

Le test de phytotoxicité réalisé sur les graine de luzerne a confirmé le pouvoir détoxifiant de levures utilisés dans le traitement du RC.

L'ensemble des résultats montrent l'importance de l'utilisation de ces souches de levures dans des projets de bioremédiation des effluents colorés.

A partir des résultats de cette étude, plusieurs perspectives peuvent être suggérées, en particulier :

- Etendre l'étude à d'autres colorants ainsi qu'à leurs mélanges
- Etudier d'autres enzymes supposées être impliquées dans la décoloration
- Etudier la possibilité de réutilisation des cellules immobilisées pour d'autres cycles
- Améliorer les propriétés adsorbantes des souches par des méthodes d'activation
- Optimiser les facteurs influent la biosorption par la méthodologie de surface de réponse qui suit le criblage
- Effectuer des tests de cytotoxicité, génotoxicité et phototoxicité sur d'autres espèces

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abidin, C. Z. A., Fahmi, M. R., Soon-An, O., Makhtar, S. N. N. M., & Rahmat, N. R. (2015).** Decolorization of an azo dye in aqueous solution by ozonation in a semi-batch bubble column reactor. *Science Asia*, *41*, 49-54.
- Acuner, E. and F. B. Dilek, (2004).** Treatment of Tectilon Yellow 2G by *Chlorella vulgaris*, *Process Biochem.*, *39*, 623.
- Aghaie-Khouzani, M., Forootanfar, H., Moshfegh, M., Khoshayand, M.R., Faramarzi, M.A., (2012).** Decoloration of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochem. Eng. J.* *60*, 9e15.
- Aksu, Z. (2003).** Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, *38*(10), 1437-1444.
- Aksu, Z. and G. Donmez, (2003).** A Comparative Study on the Biosorption Characteristics of Some Yeasts for Remazol Blue Reactive Dye, *Chemosphere*, *50*, 1075
- Alaton, A., I. A. Balcioglu, and D. W. Bahnemann, (2002).** Advanced Oxidation of a Reactive Dyebath Effluent: Comparison of O₃, H₂O₂/UV-C and TiO₂/UV-A Processes, *Water Res.*, *36*, 1143.
- Albadarin, A. B., & Mangwandi, C. (2015).** Mechanisms of Alizarin Red S and Methylene blue biosorption onto olive stone by-product: Isotherm study in single and binary systems. *Journal of environmental management*, *164*, 86-93.
- Ali, N., Hameed, A., Siddiqui, M., Ghumro, P. B., & Ahmed, S. (2009).** Application of *Aspergillus niger* SA1 for the enhanced bioremoval of azo dyes in simulated textile effluent. *African Journal of Biotechnology*, *8*(16).
- Al Mardini, F (2008).** Etude de l'adsorption du pesticide Bromacil sur charbon actif en poudre en milieu aqueux. Effet compétiteur des matières organiques naturelles. Thèse de doctorat. Université de Poitiers.
- Amin, K. A., Hameid, H. A., & Elsttar, A. A. (2010).** Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(10), 2994-2999.
- Asgher, M., Bhatti HN., Ashraf, M., Legge, RL. (2008).** Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*; *19*:771–83.
- Asghar, A., Raman, A., Daud, W., (2015).** Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogenperoxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review. *J. Clean. Prod.* *87*, 826e838.
- Ayed, L., Mahdhi, A., Cheref, A., Bakhrouf, A., (2011).** Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Spingomonaspaucimobilis*: biotoxicity and metabolites characterization. *Desalination* *274*, 272-277
- Aubert, S. and J. P. Schwitzgubel, (2004).** Screening of Plant Species for the Phytotreatment of Wastewater Containing Sulphonated Anthraquinones, *Water Res.*, *38*, 3569.
- Bahafid, W. (2013).** Bioremédiation des sols et des eaux pollués : Etude du mécanisme et modélisation de la biosorption du Cr(VI) par des souches de levures. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences et Techniques. Fès.
- Banat, I. M., P. Nigam, D. Singh, and R. Marchant. (1996).** Microbial Decolorization of Textile Dye-Containing Effluents: A Review, *Bioresour. Technol.*, *58*, 217.
- Belala, Z., Jeguirim, M., Belhachemi, M., et al., (2011).** Biosorption of basic dye from aqueous solutions by date stones and palm-trees waste: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. *Desalination* *271*, 80-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2010.12.009>
- Bellou, S., Makri, A., Sarris, D., Michos, K., Rentoumi, P., Celik, A., Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2014).** The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by Zygomycetes. *J. Biotechnol.* *170*, 50e59.

- Benaissa, A. (2011).** Etude de la dégradation photocatalytique d'un colorant synthétique et d'un tensioactif. Thèse de doctorat, Université Mentouri Constantine.
- Ben Mansour, H., Boughzala, O., Dridi, D., Barillier, D., Chekir-Ghedira, L., & Mosrati, R. (2011).** Les colorantes textiles sources de contamination de l'eau : CRIBLAGE de la toxicité et des méthodes de traitement. *Revue Des Sciences de L'eau*, 24(3), 209.
- Bouyarmane, H. (2014).** Étude des processus d'adsorption et de photodégradation des polluants organiques supportés sur les composites TiO₂-Apatite. Thèse doctorat, Université Mohammed V-Agdal. Rabat.
- Brüschweiler, B.J., Merlot, C. (2017).** Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88(Supplement C), 214-226.
- Baocheng, Q. U., Jiti, Z. H. O. U., XIANG, X., ZHENG, C., Hongxia, Z. H. A. O., & Xiaobai, Z. H. O. U. (2008).** Adsorption behavior of Azo Dye CI Acid Red 14 in aqueous solution on surface soils. *Journal of Environmental Sciences*, 20(6), 704-709.
- Bhowmick, D.C., Bal, B., Chatterjee, N.S., Ghosh, A.N., Pal, S. (2009).** A low-GC Gram-positive *Thermoanaerobacter*-like bacterium isolated from an Indian hot spring contains Cr(VI) reduction activity both in the membrane and cytoplasm. *J. App. Microbiol.* 106: 2006–2016.
- Caritá, R., & Marin-Morales, M. A. (2008).** Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*, 72(5), 722-725.
- Casieri, L., Varese, G. C., Anastasi, A., Prigione, V., Svobodova, K., Marchisio, V. F., & Novotný, Č. (2008).** Decolorization and detoxication of reactive industrial dyes by immobilized fungi *Trametes pubescens* and *Pleurotus ostreatus*. *Folia microbiologica*, 53(1), 44.
- Chang, J. S., Chou, C., Lin, Y. C., Lin, P. J., Ho, J. Y., & Hu, T. L. (2001).** Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Research*, 35(12), 2841-2850.
- Charumathi, D., Nilanjana, D., (2010).** Bioaccumulation of synthetic dyes by *Candida tropicalis* growing in sugarcane bagasse extract medium. *Adv. Biol. Res.* 4, 233-240.
- Charumathi, D., & Nilanjana, D., (2010).** Removal of synthetic dye basic Violet 3 by immobilised *Candida tropicalis* grown on sugarcane bagasse extract medium. *Int J Eng Sci Technol*, 2(9), 4325-4335.
- Chatha, S.A.S., Asgher, M., Iqbal, H.M.N. (2017).** Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(16), 14005-14018.
- Chen, B.-Y., Ma, C.-M., Han, K., Yueh, P.-L., Qin, L.-J., Hsueh, C.-C. (2016).** Influence of textile dye and decolorized metabolites on microbial fuel cell-assisted bioremediation. *Bioresource Technology*, 200(Supplement C), 1033-1038.
- Chen, B. Y., Zhang, M. M., Chang, C. T., Ding, Y., Chen, W. M., & Hsueh, C. C. (2011).** Deciphering azo dye decolorization characteristics by indigenous *Proteus hauseri*: chemical structure. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(2), 327-333.
- Chen, H., Burns, L., (2006).** Environmental analysis of textile products. *Cloth. Text. Res. J.* 24,
- Crini, G., (2006).** Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. *Bioresour. Technol.* 97, 1061e1085.
- Churchley, J. H., Greaves, A. J., Hutchings, M. G., James, A. E., & Phillips, D. A. S. (2000).** The development of a laboratory method for quantifying the bioelimination of anionic, water soluble dyes by a biomass. *Water Research*, 34(5), 1673-1679.
- Danouche, M., (2017).** Traitement du Chrome (VI) et du colorant Rouge Carmoisine en milieux aqueux par des procédés Biologiques. Faculté des sciences et techniques. Fès

- Das, D., Charumathi, D., & Das, N. (2011).** Bioaccumulation of the synthetic dye Basic Violet 3 and heavy metals in single and binary systems by *Candida tropicalis* grown in a sugarcane bagasse extract medium: Modelling optimal conditions using response surface methodology (RSM) and inhibition kinetics. *Journal of hazardous materials*, 186(2-3), 1541-1552.
- Dawkar, V. V., U. U. Jadhav, S. U. Jadhav, and S. P. Govindwar, (2008).** Biodegradation of Disperse Textile Dye Brown 3REL by Newly Isolated *Bacillus* sp. *VUS, J. Appl. Microbiol.*, 105, 14
- Dergal, F, Mansri, A, Billon, L. (2013).** *Chemical Engineering Transactions*. 32, 2131-2136.
- Dhankhar, R., & Hooda, A. (2011).** Fungal biosorption—an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental technology*, 32(5), 467-491.
- Dil, E. A., Ghaedi, M., Ghezlbash, G. R., & Asfaram, A. (2017).** Multi-responses optimization of simultaneous biosorption of cationic dyes by live yeast *Yarrowia lipolytica* 70562 from binary solution: Application of first order derivative spectrophotometry. *Ecotoxicology and environmental safety*, 139, 158-164.
- Dönmez, G. (2002).** Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(3), 363-366.
- Dos Santos, A. B., Cervantes, F. J., & van Lier, J. B. (2007).** Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource technology*, 98(12), 2369-2385.
- Draper, NR., and Smith, H. (1998).** *Applied Regression Analysis*. 3rd ed., Wiley, New York.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Benada, O., Kofroňová, O., Hubálek, T., & Nerud, F. (2007).** Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. *Chemosphere*, 69(5), 795-802.
- Ertugrul, S., Bakır, M., Donmez, G., (2008).** Treatment of dye-rich wastewater by an immobilized thermophilic cyanobacterial strain: *Phormidium* sp. *Ecol. Eng.* 32, 244-248.
- Evangelista-Barreto, N. S., Albuquerque, C. D., Vieira, R. H. S., & Campos-Takaki, G. M. (2009).** Cometary decolorization of the reactive azo dye orange II by *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. *Textile research journal*, 79(14), 1266-1273.
- Fairhead, M., Thony-Meyer, L., (2012).** Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnol.* 29, 183-191.
- Faraco, V., Pezzella, C., Miele, A., Giardina, P., Sannia, G., (2009).** Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. *Biodegradation* 20, 209-220.
- Fayoud, N., Younssi, S. A., Tahiri, S., & Albizane, A. (2015).** Etude cinétique et thermodynamique de l'adsorption de bleu de méthylène sur les cendres de bois (Kinetic and thermodynamic study of the adsorption of methylene blue on wood ashes). *J. Mater. Environ. Sci.*, 11, 3295-3306.
- Fournier, D., A. Halasz, S. Thiboutot, G. Ampleman, M. Dominic, and J. Hawari, (2004).** Biodegradation of Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-Tetrazocine (HMX) by *Phanerochaete chrysosporium*. *New Insight into the Degradation Pathway*, *Environ. Sci. Technol.*, 38, 4130.
- Freundlich, H. M. F. (1906).** Over the adsorption in solution. *J. Phys. Chem.*, 57(385471), 1100-1107.
- Gadd, G.M., (2009).** Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 13–28.
- Gallagher, K.A., Healy, M.G., Allen, S.J., (1997).** Biosorption of synthetic dye and metal ions from aqueous effluents using fungal biomass. In: Wise, D.L. (Ed.), *Global Environmental Biotechnology*. Elsevier, UK, pp. 27e50.

- Gao, F., Ding, H., Feng, Z., Liu, D., Zhao, Y. (2014).** Functional display of triphenylmethane reductase for dye removal on the surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein. *Bioresource Technology*, 169(Supplement C), 181-187.
- Gaunt, I.F., Farmer, M., Grasso, G., Gangoli, S.D., (1967).** Food Cosmet. Toxicol. 5179–185.
- Ghodake, G. S., A. A. Telke, J. P. Jadhav, and S. P. Govindwar, (2009a).** Potential of *Brassicajunceain* Order to Treat Textile Effluent Contaminated Sites, *Int. J. Phytoreme*, 11, 1.
- Ghodake, G., S. Jadhav, V. Dawkar, and S. Govindwar, (2009b).** Biodegradation of Diazo Dye Direct Brown MR by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 63, 433.
- Ghosh, A., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R. (2017).** Bioremediation of chromium complex dyes and treatment of sludge generated during the process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119(Supplement C), 448-460.
- Gomaa, O.M., Linz, J.E., Reddy, C.A., (2008).** Decolorization of Victoria Blue by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2349-2356
- Gupta, V. K., A. Rastogi, V. K. Saini, and N. Jain, (2006).** Biosorption of Copper (II) from Aqueous Solutions by *Spirogyra* Species, *J. Colloid Interf. Sci.*, 296, 59.
- Gupta V. (2009).** Application of low-cost adsorbents for dye removal—a review. *J Environ Manage*;90(8):2313–42.
- Gupta, V. K., & Rastogi, A. (2009).** Biosorption of hexavalent chromium by raw and acid-treated green alga *Oedogonium hatei* from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 396-402.
- Hai, F.I., Yamamoto, K., Nakajima, F., Fukushi, K., (2009).** Factors governing performance of continuous fungal reactor during non-sterile operation the case of a membrane bioreactor treating textile wastewater. *Chemosphere* 74, 810-817.
- Ho Y-S, McKay G. (1999).** Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochem* ;34(5):451–65.
- Hou, Y., Zhang, R., Yu, Z., Huang, L., Liu, Y., Zhou, Z. (2017).** Accelerated azo dye degradation and concurrent hydrogen production in the single-chamber photocatalytic microbial electrolysis cell. *Bioresource Technology*, 224(Supplement C), 63-68.
- Hamdaoui O., Naffrechoux E., (2007).** “Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon. Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters”, *Hazardous Materials*, 147, 381-394
- Han, R., Wang, Y., Han, P., Shi, J., Yang, J., & Lu, Y. (2006).** Removal of methylene blue from aqueous solution by chaff in batch mode. *Journal of Hazardous Materials*, 137(1), 550-557.
- Hao, J., Kim H., & Chiang P.C. (2000).** Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30: 449-505.
- Haq, I., & Raj, A. (2017).** Biodegradation of Azure-B dye by *Serratia liquefaciens* and its validation by phytotoxicity, genotoxicity and cytotoxicity studies. *Chemosphere*.
- He, F., Hu, W., & Li, Y. (2004).** Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium. *Chemosphere*, 57(4), 293-301.
- Hea, X, Songa. C, Lia. Y, Wanga. N, Lei Xua. L ,Hanb. X, Weic.D (2018).** Efficient degradation of Azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma tomentosum* under non-sterile conditions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150. 232–239
- Hela Z, Marc L, Sami S. (2002).** Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *P.Chrysosporium* in free and immobilized cultures. *Bioresour Technol*; 84:145–50.
- Husain, M., Husain, Q., (2011).** Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 38, 1-42.

- Imran, M., Shaharoon, B., Crowley D.E., Khalid, A., Hussain, S., Arshad, M., (2015).** The stability of textile azo dyes in soil and their impact on microbial phospholipid fatty acid profiles, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 120 :163–168.
- Ito, T., Adachi, Y., Yamanashi, Y., Shimada, Y. (2016).** Long-term natural remediation process in textile dye-polluted river sediment driven by bacterial community changes. *Water Research*, **100**(Supplement C), 458-465.
- Jadhav, J. P., Phugare, S. S., Dhanve, R. S., & Jadhav, S. B. (2010).** Rapid biodegradation and decolorization of Direct Orange 39 (Orange TGLL) by an isolated bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain BCH. *Biodegradation*, *21*(3), 453-463.
- Jadhav, J. P., & Govindwar, S. P. (2006).** Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Yeast*, *23*(4), 315-323.
- Jadhav, J.P., Parshetti, G.K., Kalme, S.D., Govindwar, S.P., (2007).**Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere* 68, 394-400. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.087>.
- Jadhav, Vishal V. Dawkar, Gajanan S. Ghodake, Sanjay P. Govindwar, (2008).** Biodegradation of Direct Red 5B, a textile dye by newly isolated *Comamonas* sp. UVS. *Journal of Hazardous Materials* 158 p : 507–516
- Jadhav, S. U., Jadhav, U.U., Dawkar, V.V., and Govindwar, S.P. (2008).** Biodegradation of Disperse Dye Brown 3REL by Microbial Consortium of *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 and *Bacillus* sp. VUS, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 13, 232.
- Janos P, Buchtova H, and Ryznarova M. (2003).** Sorption of dyes from aqueous solutions onto fly ash. *Water Res* **37**: 4938-44.
- Kagalkar, A. N., Jagtap, U.B., Jadhav, J.P., Bapat, V.A and Govindwar, S.P., (2009).** Biotechnological Strategies for Phytoremediation of the Sulfonated Azo Dye Direct Red 5B Using *Blumea malcolmi* hook, *Bioresour. Technol.*, 100, 4104.
- Kalyani, D. C., A. A. Telke, R. S. Dhanve, and J. P. Jadhav, (2008).** Ecofriendly Biodegradation and Detoxification of Reactive Red 2 Textile Dye by Newly Isolated *Pseudomonas* sp. SUK1, J. Hazard. Mater., 163, 735.
- Khataee, A.R., Dehghan, G., Zarei, M., et al., (2011).** Neural network modeling of biotreatment of triphenylmethane dye solution by a green macroalgae. *Chem. Eng. Res. Des.* 89, 172e178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2010.05.009>
- Khehra, M. S., H. S. Saini, D. K. Sharma, B. S. Chadha, and S. S. Chimni, (2005).** Comparative Studies on Potential of Consortium and Constituent Pure Bacterial Isolates to Decolorize Azo Dyes, *Water Res.*, 39, 5135.
- Khlifi, R., Belbahri, L., Woodward, S., Ellouz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., Mechichi, T.,(2010).** Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *J. Hazard. Mater* 175, 802e808.
- Kumar, R., Ahmad, R., (2011).** Biosorption of hazardous crystal violet dye from aqueous solution onto treated ginger waste (TGW). *Desalination* 265, 112-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2010.07.040>
- Lade, H., Kadam, A., Paul, D., Govindwar, S. (2015).** Biodegradation and detoxification of textile azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic/aerobic processes. *Excli Journal Experimental and Clinical Science*, 14, 158
- Lagane, C. (2007).** *Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR-gamma dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de Candida Albicans. Implication de PPAR-gamma* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Langmuir, I. (1918).** The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, 40, 1361–1368

- Le Marechal, AI, Križanec, B., (2012).** Textilefinishing industry as an important source of organic pollutants, in: Tomasz Puzyn (Ed.), *Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention-Environmental and Analytical Update*, InTech.
- Levin, L., Forchiassin, F., and Viale, A. (2005).** Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements, *Process Biochemistry*, vol. 40 , pp. 1381–1387.
- Libra, J.A., Borchert, M., Banit, S., (2003).** Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 736-744.
- Limousin G., Gaudet J. P., Charlet L., Szenknect S., Barthes V., Krimissa M., (2007)** Sorption isotherms: A review on physical bases, modelling and measurement”, *Applied Geochemistry*, 22, 249-275.
- Long, X., Pan, Q., Wang, C., Wang, H., Li, H., Li, X. (2017).** Microbial fuel cell photoelectrocatalytic cell combined system for the removal of azo dye wastewater. *Bioresource Technology*, (Part 1024 1), 182-191
- Lucas, M. S., C. Amaral, A. Sampaio, J. A. Peres, and A. A. Dias,(2006).** Biodegradation of the Diazo Dye Reactive Black 5 by a Wild Isolate of *Candida oleophila*, *Enzyme Microb. Technol.*, 39-51
- Machado, K. M. G., L. C. A. Compart, R. O. Morais, L. H. Rosa, and M. H. Santos, (2006).** Biodegradation of Reactive Textile Dyes by Basidiomycetous Fungi from Brazilian Ecosystems, *Braz. J. Microbiol.*, 37-481
- McKay, M. D., Beckman, R. J., & Conover, W. J. (1979).** Comparison of three methods for selecting values of input variables in the analysis of output from a computer code. *Technometrics*, 21(2), 239-245.
- Mahmood, K., & Sung, H. J. (2014).** A dye-sensitized solar cell based on a boron-doped ZnO (BZO) film with double light-scattering-layers structured photoanode. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(15), 5408-5417.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D., (2010).** Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour. Technol.* 101, 2331-2350
- Malik, A., (2004).** Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30, 261– 278.
- Mansour H.B, Houas I, Montassar. F, Ghedira K, Barillier D, Mosrati R, Chekir- Ghedira L, (2012).** Alteration of in vitro and acute in vivo toxicity of textile dyeing wastewater after chemical and biological remediation, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (7) 2634–2643
- Martorell, M. M., Pajot, H. F., & de Figueroa, L. I. (2012).** Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. *International biodeterioration & biodegradation*, 66(1), 25-32.
- McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R., and Smyth, W.F., (2001).** Microbial decolorization and degradation of textile dyes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, , vol. 56, pp. 81–87.
- Meddeb, R. (2000).** L'industrie du textile-habillement au Maroc : les besoins des chefs d'entreprise et les conditions des femmes dans les PME. Document de travail, Genève.
- Meehan, C., Banat, I.M., McMullan, G., Nigam, P., Smyth, F., Marchant, R., (2000).** Decolourization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Environ. Int.* 26, 75–79.
- Meng, X., Liu, G., Zhou, J., Fu, Q.S., (2014).** Effects of redox mediators on azo dye decolorization by *Shewanella* algae under saline conditions. *Bioresour. Technol.* 151, 63e68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.131>.
- Mishra G, Tripathy M., (1993).** A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Colourage*; 40:35-35.
- Mokhtar, N., Aziz, E. A., Aris, A., Ishak, W. F. W., & Ali, N. S. M. (2017).** Biosorption of azo-dye using marine macro-alga of *Euchema spinosum*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(6), 5721-5731.

- Morilhat, J. P., Leleu, J. B., & Bonaly, R. (1977).** Études sur la composition chimique des parois d'une levure candida après croissance sur n paraffine. *Mycopathologia*, 61(1), 49-54.
- Moussavi, G., & Khosravi, R. (2011).** The removal of cationic dyes from aqueous solutions by adsorption onto pistachio hull waste. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(10), 2182-2189.
- Munari, F. M., Gaio, T. A., Calloni, R., & Dillon, A. J. (2008).** Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1383-1392.
- Nandi B, Goswami A, Purkait M. (2009).** Removal of cationic dyes from aqueous solutions by kaolin: kinetic and equilibrium studies. *Appl Clay Sci*;42(3-4):583-90.
- Ncibi, M. C., Ranguin, R., Pintor, M. J., Jeanne-Rose, V., Sillanpää, M., & Gaspard, S. (2014).** Preparation and characterization of chemically activated carbons derived from Mediterranean *Posidonia oceanica* (L.) fibres. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 109, 205-214.
- Nguyen, L. N., Hai, F. I., Dosseto, A., Richardson, C., Price, W. E., & Nghiem, L. D. (2016).** Continuous adsorption and biotransformation of micropollutants by granular activated carbon-bound laccase in a packed-bed enzyme reactor. *Bioresource technology*, 210, 108-116.
- Novotný, Č., Dias, N., Kapanen, A., Malachová, K., Vándrovcová, M., Itävaara, M., & Lima, N. (2006).** Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere*, 63(9), 1436-1442.
- Ogugbue, C.J, T. Sawidis, N.A. Oranusi,(2012).** Bioremoval of chemically different synthetic dyes by *Aeromonashydrophila* in simulated wastewater containing dyeing auxiliaries, *Ann. Microbiol.* 62 (3) 1141-1153.
- Olukanni, D. O., Osuntoki, A. A., & Gbenle, G. O. (2009).** Decolourization of azo dyes by a strain of *Micrococcus* isolated from a refuse dump soil. *Biotechnology*, 8(4), 442-448.
- Ong, S. A., Toorisaka, E., Hirata, M., & Hano, T. (2005).** Decolorization of azo dye (Orange II) in a sequential UASB-SBR system. *Separation and Purification Technology*, 42(3), 297-302.
- Ooi, J., Lee, L.Y., Hiew, B.Y.Z., Thangalazhy-Gopakumar, S., Lim, S.S., Gan, S. (2017).** Assessment of fish scales waste as a low cost and eco-friendly adsorbent for removal of an azo dye: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Bioresource Technology*, 245(Part A), 656-664.
- Osman, M.Y. Sharaf, I.A. Osman, H.M.Y. El-khouly, Z.A El Ahmed, (2004)** *Br. J. Biomed.Sci.* 61 128-132.
- Pandey, A., P. Singh, and L. Iyengar, (2007).** Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes, *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 59, 73
- Pagga, U., Brown, D. (1986).** The degradation of dyestuffs part II: behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*, 15, 4, 479-491
- Pan, R., Cao, L., Zhang, R., (2009).** Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of *CuresistantPenicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19. *J. Hazard. Mater* 171, 761-766.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2008).** Citric acid production by *Yarrowialipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresour. Technol.* 99, 2419-2428.
- Parikh, A. and D. Madamwar,(2005).** Textile Dye Decolorization Using Cyanobacteria, *Biotechnol. Lett.*, 27, 323.
- Parshetti, G.K., Telke, A.A., Kalyani, D.C., Govindwar, S.P., (2010).** Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye Methyl Orange by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *J. Hazard. Mater.* 176, 503-509.
- Parshetti, G., Kalme, S., Saratale, G., & Govindwar, S. (2006).** Biodegradation of Malachite Green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chimica Slovenica*, 53(4).

- Patil, P., Desai, N., Govindwar, S., Jadhav, J. P., & Bapat, V. (2009).** Degradation analysis of Reactive Red 198 by hairy roots of *Tagetes patula* L.(Marigold). *Planta*, 230(4), 725-735.
- Perrin Robert & Scharff Jean-pierre. (1999).** *Chimie Industrielle*. 2^{ème} édition. Maisson Paris Milam barcelon.
- Phugare, SS., Kalyani, D.C., Surwase, S.N., Jadhav, J.P, (2011).** Ecofriendly degradation, decolorization and detoxification of textile effluent by a developed bacterial consortium, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74. 1288–1296.
- Podkoscielny, P., & Nieszporek, K. (2011).** Adsorption of phenols from aqueous solutions: equilibria, calorimetry and kinetics of adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354, 282–291.
- Pricelius, S., Held, C., Sollner, S., Deller, S., Murkovic, M., Ullrich, R., ... & Guebitz, G. M. (2007).** Enzymatic reduction and oxidation of fibre-bound azo-dyes. *Enzyme and microbial technology*, 40(7), 1732-1738.
- Punzi, M.; Anbalagan, A.; Aragaoborner, R.; Svensson B.-M.; Jonstrup, M. and Mattiasson, B. (2015).** Degradation of a textile azo dye using biological treatment followed by photo-Fenton oxidation: Evaluation of toxicity and microbial community structure. *Chemical Engineering Journal*, v. 270, 0, 290-299.
- Purkait M, DasGupta S, De S. (2005).** Adsorption of eosin dye on activated carbon and its surfactant-based desorption. *J Environ Manage*;76(2) :135–42.
- Rabier, F. (2007).** *Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire* (Doctoral dissertation).
- Rai, H., M. Bhattacharya, J. Singh, T. K. Bansal, P. Vats, and U. C. Banerjee, (2005).** Removal of Dyes from the Effluent of Textile and Dyestuff Manufacturing Industry: A Review of Emerging Techniques with Reference to Biological Treatment, ' Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 35, 219.
- Rajee, O., & Patterson, J. (2011).** Decolorization of azo dye (orange MR) by an autochthonous bacterium, *Micrococcus* sp. DBS 2. *Indian journal of microbiology*, 51(2), 159-163.
- Ramsay, J. A., Mok, W. H. W., Luu, Y. S., & Savage, M. (2005).** Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 61(7), 956-964.
- Rao, G., Lu, C., Su, F., (2007).** Sorption of divalent metal ions from aqueous solution by carbon nanotubes: a review. *Sep. Purif. Technol.* 58 (1), 224–231.
- Ravikumar, K., Krishnan, S., Ramalingam, S., and Balu, K. (2007).** Optimization of process variables by the application of response surface methodology for dye removal using a novel adsorbent, *Dyes and Pigments*, vol.72, pp. 66–74.
- Reife, A., Freeman, H., (1996).** *Environmental Chemistry of Dyes and Pigments*. John-Wiley & Sons, Inc., New York.
- Robinson, T., G. McMullan, R. Marchant, and P. Nigam, (2001).** Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative, *Bioresour. Technol.*, 77, 247.
- Rodriguez Couto, S., (2009).** Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnol. Adv.* 27, 227-235.
- Rouessac, F. (1994).** *Dans Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes*, Masson, Paris.
- Saber-Samandari, S., & Heydaripour, J. (2015).** Onion membrane: an efficient adsorbent for decoloring of wastewater. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 13, 16.
- Sadeghi, A., Bazardehi, M. A. K., Raffae, S., & Zarif, B. (2014).** Biotransformation of carmoisine and reactive black 5 dyes using *saccharomyces cerevisiae*. *Health*, 6(10), 859.
- Saraf, S., & Vaidya, V. K. (2015).** Comparative Study of Biosorption of Textile Dyes Using Fungal Biosorbents. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* Special Issue-2: 357-365.
- Saratale, R.G., Gandhi, S.S., Purankar, M.V., Kurade, M.B., Govindwar, S.P., Oh, S.E., Saratale, G.D., (2013).** Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye C.I. Remazol Red and textile effluent by isolated *Lysinibacillus* sp. RGS. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 658-667.

- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2011).** Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138-157.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., and Govindwar, S.P., (2009a).** Decolorization and biodegradation of textile Navy blue HER by *Trichosporon beigeli* NCIM-3326, *J. Hazard. Mater.*, vol. 166, pp. 1421–1428.
- Saratale, R. G., G. D. Saratale, D. C. Kalyani, J. S. Chang, and S. P. Govindwar, (2009b).** Enhanced Decolorization and Biodegradation of Textile Azo Dye Scarlet R by Using Developed Microbial Consortium-GR, *Bioresour. Technol.*, 100, 2493
- Saratale, G. D., S. D. Chen, Y. C. Lo, R. G. Saratale, and J. S. Chang, (2008).** Outlook of Biohydrogen Production from Lignocellulosic Feedstock Using Dark Fermentation— A Review, *J. Sci. Ind. Res.*, 67, 962.
- Saratale, G. D., S. D. Kalme, and S. P. Govindwar, (2006).** Decolorization of Textile Dyes by *Aspergillusochraceus*,” *Ind. J. Biotechnol.*, 5, 407
- Sawhney R, Kumar A. (2011).** Congo Red (azo dye) decolorization by local isolate VTII inhabiting dye effluent exposed soil. *Int J Environ Sci*;1:1261–7.
- Sen TK, Afroze S, Ang H. (2011).** Equilibrium, kinetics and mechanism of removal of methylene blue from aqueous solution by adsorption onto pine cone biomass of *Pinus radiata*. *Water Air Soil Pollut*; 218:499–515.
- Senturk, H. B., Ozdes, D., & Duran, C. (2010).** Biosorption of Rhodamine 6G from aqueous solutions onto almond shell (*Prunus dulcis*) as a low cost biosorbent. *Desalination*, 252(1-3), 81-87.
- Seyis, I., & Subasioglu, T. (2008).** Comparison of live and dead biomass of fungi on decolorization of methyl orange. *African Journal of Biotechnology*, 7(12).
- Shabbir, S., Faheem, M., Ali, N., Kerr, P.G., Wu, Y. (2017).** Evaluating role of immobilized periphyton in bioremediation of azo dye amaranth. *Bioresource Technology* 225. 395-401.
- Shah, M. P., Patel, K. A., Nair, S. S., & Darji, A. M. (2013).** Microbial degradation of textile dye (Remazol Black B) by *Bacillus* spp. ETL-2012. *Journal of Bioremediation & Biodegradation (USA)*, 4(2).
- Sharma, P., Singh, L., Dilbaghi, N., (2009).** Biodegradation of Orange II dye by *Phanerochaete chrysosporium* in simulated wastewater. *J. Sci. Ind. Res.* 68, 157e161
- Sharma, S., Kalpana, A., Shweta, S.V., Singh, P., et al., (2007).** Toxicity assessment of textile dye wastewater using swiss albino rats. *Aust. J. Ecotoxicol.* 13, 81–85.
- Shawabkeh RA, and Tutunji MF. (2003).** Experimental study and modeling of basic dye sorption by diatomaceous clay. *Appl Clay Sci* 24: 111-120
- Sidiras, D., Batzias, F., Schroeder, E., Ranjan, R., & Tsapatsis, M. (2011).** Dye adsorption on autohydrolyzed pine sawdust in batch and fixed-bed systems. *Chemical Engineering Journal*, 171(3), 883-896.
- Solis, M.; Solis, A.; Perez, H. I.; Manjareez, N. and Flores, M. (2012).** Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry*, v. 47, 12, 1723-1748.
- Sunkar, S., & Renugadevi, K. (2015).** *Citrobacter freundii* mediated degradation of textile dye Mordant Black 17. *Journal of Water Process Engineering*, 8, 28-34.
- Tan, N. C., Van Leeuwen, A., Van Voorthuizen, E. M., Slenders, P., Prenafeta-Boldu, F. X., Temmink, H., ... & Field, J. A. (2005).** Fate and biodegradability of sulfonated aromatic amines. *Biodegradation*, 16(6), 527-537.
- Tan, L., Li, H., Ning, S., & Xu, B. (2014).** Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by suspended growing cells and immobilized cells of a newly isolated yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1. *Bioresource technology*, 158, 321-328.

- Tan, L., Ning, S., Zhang, X., & Shi, S. (2013).** Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. *Bioresource technology*, 138, 307-313.
- Tehrani-Bagha, A.R., Mahmoodi, N.M., Menger, F.M., (2010).** Degradation of a persistent organic dye from colored textile wastewater by ozonation. *Desalination* 260, 34-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2010.05.004>
- Telke, A., D. Kalyani, J. Jadhav, and S. Govindwar, (2008).** Kinetics and Mechanism of Reactive Red 141 Degradation by a Bacterial Isolate *Rhizobium radiobacter* MTCC 8161,," *Acta Chim. Slov.*, 55, 320.
- Tian, Y., Ji, C., Zhao, M., Xu, M., Zhang, Y., Wang, R., (2010).** Preparation and characterization of baker's yeast modified by nano-Fe₃O₄: application of biosorption of methyl violet in aqueous solution. *Chem. Eng. J.* 165 (2), 474–481.
- Tony, B. D., Goyal, D., & Khanna, S. (2009).** Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(4), 462-469.
- Usha, M. S., Sanjay, M. K., Gaddad, S. M., & Shivannavar, C. T. (2010).** Degradation of h-acid by free and immobilized cells of *Alcaligenes latus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 931-945.
- Van der Zee, F. P., & Villaverde, S. (2005).** Combined anaerobic–aerobic treatment of azo dyes—a short review of bioreactor studies. *Water research*, 39(8), 1425-1440.
- Vatandoostarani, S., Lotfabad, T. B., Heidarinasab, A., & Yaghmaei, S. (2017).** Degradation of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 62-72.
- Vitor, V., Corso, C.R., (2008).** Decolorization of textile dye by *Candida albicans* isolated from industrial effluents. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1353-1357.
- Waghmode, T.R., Kurade, M.B., Kabra, A.N., and Govindwar, S.P., (2012).** Degradation of Remazol Red dye by *Galactomyces geotrichum* MTC 1360 leading to increased iron uptake in *Sorghum vulgare* and *Phaseolus mungo* from soil, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, vol. 17.
- Waghmode, T. R., Kurade, M. B., & Govindwar, S. P. (2011).** Time dependent degradation of mixture of structurally different azo and non-azo dyes by using *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *International biodeterioration & biodegradation*, 65(3), 479-486.
- Weber W, Morris J. (1963).** Kinetics of adsorption on carbon from solution. *J Sanit Eng Div Am Soc Civ Eng* ;89(17):31–60
- Wibulswas R. (2004).** Batch and fixed bed sorption of methylene blue on precursor and QACs modified montmorillonite. *Separation and Purification Technology* 39: 3-12.
- Xiang, X., Chen, X., Dai, R., Luo, Y., Ma, P., Ni, S., Ma, C. (2016).** Anaerobic digestion of recalcitrant textile dyeing sludge with alternative pretreatment strategies. *BioresourceTechnology*, 222(Supplement C), 252-260.
- Xing, B., & Pignatello, J. J. (1997).** Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly (vinyl chloride) and soil organic matter. *Environmental Science & Technology*, 31(3), 792-799.
- Xu, M., Guo, J., & Sun, G. (2007).** Biodegradation of textile azo dye by *Shewanella decolorationis* S12 under microaerophilic conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(3), 719-726.
- Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T., Hashimoto, Y., (1975).** Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Lett.* 1, 91–96.
- Yan, H. and G. Pan, (2004).** Increase in Biodegradation of Dimethyl Phthalate by *Closterium lunula* Using Inorganic Carbon,," *Chemosphere*, 55, 1281.
- Yang, Q., Angly, F.E., Wang, Z., Zhang, H., (2011).** Wastewater treatment systems harbour specific and diverse yeast communities. *Biochem. Eng. J.* 58, 168-176.

- Yu, Z., Wen, X., (2005).** Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 56, 109-114.
- Zhang, Z., O'Hara, I. M., Kent, G. A., & Doherty, W. O. (2013).** Comparative study on adsorption of two cationic dyes by milled sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 42, 41-49.
- Zhao, S., & Zhou, T. (2016).** Biosorption of methylene blue from wastewater by an extraction residue of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Bioresource technology*, 219, 330-337.
- Zhou, J.L., Banks, C.J., (1991).** Removal of humic acid fraction by *Rhizopus arrhizus*: uptake and kinetic studies. *Environ. Technol.* 12, 859-869.