

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI TIZI OUZOU

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE



Thèse de Doctorat en Sciences  
Spécialité : Chimie  
Option : Chimie de l'Environnement  
Présentée par Mme BOUCHERIT Nabila

THEME :

**Traitement des colorants textiles par procédés de  
couplage : Fenton-enzyme**

Soutenu devant le jury composé de :

Mr. LOUNICI Hakim	Professeur	Université de Bouira	Président
Mr. HOUALI Karim	Professeur	Université de Tizi-Ouzou	Examineur
Mr. MEZIANE Smail	Professeur	Université de Tizi-Ouzou	Examineur
Mr. DJAIDJA Abdelhamid	MCA	Université de Bouira	Examineur
Mr. ABOUSEOUD Mahmoud	Professeur	Université de Médéa	Rapporteur
Mme. ADOUR Lydia	Professeur	Université d'Alger 1	Co-rapporteur

**Tizi-Ouzou 2016**

## *Remerciements*

Les travaux de recherche qui font l'objet de cette thèse ont été réalisés au niveau de laboratoire de physico-chimie du complexe Antibiotical-Saidal de Médéa et au niveau du laboratoire de Biomatériaux et de Phénomènes de Transport de l'Université de Médéa dont je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé afin de finaliser ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur ABOUSEOUD Mahmoud, Professeur à l'Université de Médéa pour la confiance que m'accordé en me proposant ce sujet, avec qui j'ai eu le grand plaisir de travailler tout au long de la réalisation de cette thèse. Sa disponibilité, ses compétences scientifiques, ses orientations et remarques pointues et sa grande qualité humaine, m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie particulièrement Madame ADOUR Lydia, Professeur à l'Université d'Alger, pour avoir co-dirigé cette thèse. Son aide précieuse, ses conseils, ses critiques pertinentes et son soutien permanent m'a permis de ne jamais faiblir et de poursuivre toujours plus loin mes travaux.

Je me trouve très sensible à l'honneur que me fait Monsieur LOUNICI Hakim, Professeur à l'Université de Bouira de bien vouloir assurer la présidence de jury.

J'exprime également mes vifs remerciements à Monsieur HOUALI Karim, Professeur à l'Université de Tizi-Ouzou et Doyen de la faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques, pour avoir consacré de son temps pour examiner mon travail et faire partie du jury de thèse.

J'assure une profonde gratitude à Monsieur MEZIANE Smail, Professeur à l'Université de Tizi-Ouzou, qui a pris la peine d'examiner ce travail.

Je remercie également Monsieur DJAIDJA Abdel-Hamid, Maitre de Conférences à l'Université de Bouira, pour avoir mobilisé son temps afin de juger ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur CHERIF Tayeb, Chef de Service au complexe Antibiotical de Médéa, qui n'a ménagé aucun effort pour m'aider et de m'assurer la réalisation d'une grande partie de mes expériences.

Sans oublier de remercier Monsieur ATSAMNIA Djamel, Maitre Assistant à l'Université de Médéa d'avoir facilité la réalisation d'une partie de mes expériences au niveau du Hall Technologique de l'Université de Médéa.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à ma mère qui n'a jamais cessé de m'aider et de m'encourager dans les moments de doute et de découragement, afin d'aller jusqu'à la finalisation de ce travail.

Sans oublier d'exprimer mes intenses remerciements à mes sœurs particulièrement Nadia, et mes frères.

Mes remerciements seront incomplets si je ne fais pas mention de mon conjoint, qui n'a cessé de m'encourager dans les moments les plus difficiles, je te remercie Mohamed pour ton aide et ta compréhension.

Enfin, j'adresse mes reconnaissances à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

## Résumé

Un colorant azoïque : JD 106 et un colorant anthraquinonique : BD 77 ont été traités par application des procédés : enzymatique et chimique. Dans une première partie, la peroxydase extraite de *Cucurbita pepo* a été isolée et caractérisée. Les résultats obtenus montrent qu'un pH de 7 et une température de 40°C donnent une activité enzymatique maximale. Les ions métalliques :  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  sont des activateurs. Tandis que,  $\text{K}^+$  et  $\text{Zn}^{2+}$  sont des inhibiteurs.

Avec l'enzyme libre, des rendements de décoloration de 89.45 et de 70.26 % ont été atteints pour le JD 106 et le BD 77 à pH, activité enzymatique, concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et concentration de colorant égalent à 2, 2.25 et 1.75 UI.ml<sup>-1</sup>, 1 et 10 mM et 50 et 80 mg.L<sup>-1</sup> dans un temps de 2 et 10 min, respectivement. Cependant, avec l'enzyme immobilisée, des rendements de décoloration de 75.66 et de 71.14% ont été atteints pour le JD 106 et le BD 77 à pH, activité enzymatique, concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et concentration de colorant égalent à 2, 0.5 et 1.48 UI.g<sup>-1</sup>, 0.1 et 0.12 M et 80 et 180 mg.L<sup>-1</sup> dans un temps de 15 et 20 min, respectivement.

Par la suite, la décoloration de ces deux colorants par le procédé Fenton a été étudiée. Le rendement de décoloration a été amélioré par rapport au traitement enzymatique pour le JD 106 et le BD 77 pour un pH 2, des concentrations des ions ferreux de 2.5 et 1.25 mM, des concentrations de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et 8 et 5 mM et de concentration de colorant de 50 mg.L<sup>-1</sup>, respectivement.

Cette étude a montré que les couplages (séquentiel Fenton suivi par peroxydase, séquentiel peroxydase suivi par Fenton et simultané peroxydase avec Fenton) ont donné des résultats très prometteurs. La dose des ions ferreux est réduit jusqu'à 0.125 mM et les rendements de décoloration atteignent plus de 98 %.

**Mots clés :** colorant, traitement, C-peroxydase, Fenton, textile, couplage.

## Abstract

An azo dye DY 106 and an anthraquinonic dye: DB 77 were treated by application of the processes: enzymatic and chemical. In the first part, the peroxidase extracted from *Cucurbita pepo* was isolated and characterized. The results obtained, show that at pH of 7 and at temperature of 40°C a maximum enzymatic activity was reached. Metal ions:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  are activators. While,  $\text{K}^+$  and  $\text{Zn}^{2+}$  are inhibitors.

With the free enzyme, efficiency of decolourisation of 89.45 and 70.26 % were reached for the DY 106 and the DB 77 at pH, enzymatic activity, concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and concentration of dye equalizes to 2, 2.25 and 1.75 UI.ml<sup>-1</sup>, 1 and 10 mM and 50 and 80 mg.L<sup>-1</sup> in a time of 2 and 10 min, respectively. However, with the immobilized enzyme, efficiency of decolourisation of 75.66 and 71.14 % were reached for the DY 106 and the DB 77 at pH, enzymatic activity,  $\text{H}_2\text{O}_2$  dose and concentration of dye equalizes to 0.5 and 1.48 UI.g<sup>-1</sup>, 0.1 and 0.12 M and 80 and 180 mg.L<sup>-1</sup> in a time of 15 and 20 min, respectively.

The decolourisation of these two dyes by the Fenton process was studied. The Efficiency of decolourisation was improved compared to the enzymatic treatment for the DY 106 and the DB 77 at a pH 2, dose of the ferrous ions of 2.5 and 1.25 mM, concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  of 8 and 5 mM and concentration of dye of 50 mg.L<sup>-1</sup>, respectively.

This study showed that Combined Fenton-Enzymatic Process (sequential Fenton followed by peroxidase, sequential peroxidase followed by Fenton and simultaneous peroxidase with Fenton) gave very promising results. The dose of ferrous ions was reducing up to 0.125 mM and the efficiency of decolourisation reaches more than 98%.

**Key words:** dye, treatment, C-peroxidase, Fenton, textile, coupling.

# Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Abréviations et symboles	
<b>Introduction générale</b>	1
<b>Chapitre I : Colorants textiles</b>	
I.1. Généralités sur les colorants	4
<i>I.1.1. Introduction</i>	4
<i>I.1.2. Couleur et structure chimique</i>	4
<i>I.1.3. Classification des colorants textiles</i>	6
I.2. Colorants azoïques	7
<i>I.2.1. Synthèse des colorants azoïques</i>	8
A. Diazotation	8
B. Copulation	9
C. Colorants stilbeniques	9
<i>I.2.2. Transformation des colorants azoïques</i>	10
I.3. Colorants anthraquinoniques	12
<i>I.3.1. Synthèse des colorants anthraquinoniques</i>	12
<i>I.3.2. Transformation des colorants anthraquinoniques</i>	13
I.4. Toxicité des colorants azoïques et anthraquinoniques	14
I.5. Pollution engendrée par les colorants textiles	15
I.6. Conclusion	17
<b>Chapitre II : Procédés de traitement des colorants textiles</b>	
II.1. Introduction	18
II.2. Procédés classiques de traitement des colorants textiles	18
<i>II.2.1. Procédés physiques</i>	18
A. Adsorption	18
B. Filtration membranaire	19
C. Coagulation/floculation	19
<i>II.2.2. Procédés chimiques</i>	19
<i>II.2.3. Procédés biologiques</i>	20
A. Action des bactéries	20
B. Action des Fungi	20
C. Action des algues	21
II.3. Procédés alternatifs	21
<i>II.3.1. Procédés enzymatiques</i>	22
A. Laccases	22
B. Peroxydases	23
B.1. Structure moléculaire et cycle catalytique	23
B.2. Classification	25
B.3. Applications de la peroxydase	26

B.4. Immobilisation de la peroxydase	30
II.3.2. <i>Procédés d'oxydations avancées</i>	35
A. Réactivité des radicaux hydroxyle (HO <sup>•</sup> )	35
B. Principaux procédés d'oxydation avancée	36
B.1. Procédés photochimiques	37
B.2. Irradiation avec les Ultrasons	38
B.3. Procédés électrochimiques	39
C. Procédés Fenton	39
C.1. Principe	39
C.2. Mécanisme réactionnel	40
C. 3. Cinétique de dégradation	42
C. 4. Paramètres influençant le procédé Fenton	42
D. Classification des procédés Fenton hybrides	43
II.3. Couplage du procédé Fenton et procédés biologiques	45
II.4. Conclusion	46
<b>Chapitre III : Matériel et méthodes</b>	
III.1. Introduction	49
III.2. Matériel	49
III.3. Méthodes expérimentales	51
III.3.1. <i>Isolation de la peroxydase : brute et partiellement purifiée</i>	51
III.3.2. <i>Caractérisation de la C-peroxydase</i>	52
A. Dosage de l'activité enzymatique	52
B. Dosage des protéines totales	54
C. Détermination du poids moléculaire moyen de C-peroxydase	55
D. Stabilité de la C-peroxydase	57
E. Facteurs influençant l'activité enzymatique de la C-peroxydase	57
E.1. Effet du pH	57
E.2. Effet des ions métalliques	57
E.3. Effet de la température	57
F. Immobilisation de la C-peroxydase	58
III.3.3. <i>Etude de décoloration par la C-peroxydase libre et immobilisée</i>	59
A. Effet du pH	60
B. Effet du temps de contact	61
C. Effet de la température	61
D. Effet de la concentration initiale des colorants	62
E. Effet de la concentration initiale du peroxyde d'hydrogène	62
F. Effet de l'AE	63
G. Effet des effecteurs chimiques	63
H. Utilisation des Batch successifs dans la décoloration	64
III.3.4. <i>Etude de décoloration par le procédé Fenton</i>	64
A. Effet du pH	65
B. Effet de la concentration initiale de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	65
C. Effet de la concentration initiale de Fe <sup>2+</sup>	66
D. Effet de la concentration initiale des colorants	66

<i>III.3.5. Décoloration par couplage enzymatique-Fenton</i>	66
A. Etude de la décoloration par combinaisons séquentielles	67
A.1. Procédé séquentiel Fenton-enzyme (F-E)	67
A.2. Procédé séquentiel enzyme-Fenton (E-F)	67
B. Décoloration par combinaison simultanée : C-peroxydase libre et Fenton	68
C. Décoloration par combinaison simultanée : C-peroxydase immobilisée et Fenton	68
<i>III.3.6. Caractérisation des sous produits de dégradation</i>	68
<i>III.3.7. Test de phytotoxicité des surnageant sur les grains d'haricots</i>	69
<b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	
IV.1. Caractérisation de C-peroxydase	70
IV.1.1. Détermination des paramètres de purification	70
IV.1.2. Poids moléculaire de la C-peroxydase	70
IV.1.3. Stabilité d'EEPP de C- peroxydases	72
IV.1.4. Facteurs influençant l'AE de la C-peroxydase	73
A. Effet du pH	73
B. Effet des ions métalliques	74
C. Effet de la température	75
IV.2. Immobilisation de la C-peroxydase	76
IV.3. Etude de décoloration par la C-peroxydase libre et immobilisée	78
IV.3.1. Effet du pH	78
IV.3.2. Effet du temps de contact	80
IV.3.3. Effet de la température	82
IV.3.4. Effet de la concentration initiale des colorants	84
IV.3.5. Effet de la concentration initiale de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	87
IV.3.6. Effet de l'AE de C-peroxydase	88
IV.3.7. Temps de contact optimal	90
IV.3.8. Effet des effecteurs chimiques	92
IV.3.9. Utilisation des batch successifs	93
IV.3.10. Caractérisation spectrale des surnageants et des précipités obtenus	94
A. Analyse des surnageants par spectrophotomètre UV-visible	94
B. Analyse des précipités par spectroscopie FTIR	96
IV.3.11. Conclusion	98
IV.4. Etude de décoloration chimique par la méthode Fenton	100
IV.4.1. Effet du pH	100
IV.4.2. Effet de la concentration initiale de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	101
IV.4.3. Effet de la concentration initiale de Fe <sup>2+</sup>	103
IV.4.4. Effet de la concentration initiale du colorant	105
IV.4.5. Etude cinétique de décoloration de JD 106 et de BD 77	106
IV.4.6. Cinétique de décoloration aux conditions optimales	109
IV.4.7. Caractérisation spectrale des surnageant et des précipités	111
A. Analyse par spectrophotomètre UV-visible	111
B. Analyse des précipités par spectroscopie FTIR	113

<i>IV.4.8. Conclusion</i>	114
IV.5. Décoloration par couplage des procédé enzymatique-Fenton	115
<i>IV.5.1. Procédé séquentiel : Fenton-C-peroxydase libre</i>	115
<i>IV.5.2. Procédé séquentiel : C-peroxydase libre-Fenton</i>	118
<i>IV.5.3. Décoloration par couplage simultané C-peroxydase libre-Fenton</i>	121
<i>IV.5.4. Caractérisation spectrale des produits de dégradation des procédés de couplage</i>	123
A. Analyse des surnageants par spectrophotomètre UV-visible	123
B. Analyse des précipités par spectroscopie FTIR	124
C. Analyse par CLHP	127
<i>IV.5.5. Conclusion</i>	128
IV.6. Décoloration par couplage simultané C-peroxydase immobilisée-Fenton	128
IV.7. Cinétiques de décoloration des procédés de couplage simultané	130
IV.8. Test de phytotoxicité	131
IV.9. Conclusion	136
<b>Conclusion générale</b>	138
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## *Liste des figures*

<b>Titre de la figure</b>	<b>N° de page</b>
<b>Figure I.1.</b> Réactions de diazotation	9
<b>Figure I.2.</b> Réaction de copulation du diazonium avec le phénol	9
<b>Figure I.3.</b> Mécanisme simplifié d'oxydation asymétrique d'un colorant azoïque	11
<b>Figure I.4.</b> Synthèse d'un noyau anthraquinonique	12
<b>Figure I.5.</b> Mécanisme de synthèse d'un colorant anthraquinonique disubstitué	13
<b>Figure I.6.</b> Représentation schématique des effets des effluents de l'industrie textile sur l'environnement	16
<b>Figure II.1.</b> Structure de Ferriprotoporphyryne IX des peroxydases	24
<b>Figure II.2.</b> Structure tridimensionnelle de la peroxydase de HRP	24
<b>Figure II.3.</b> Cycle catalytique de la partie hémine de la peroxydase	25
<b>Figure II.4.</b> Mécanisme d'oxydation et de polymérisation du phénol par la peroxydase	28
<b>Figure II.5.</b> Principe de la réticulation enzymatique	32
<b>Figure II.6.</b> Méthode d'immobilisation par inclusion dans une matrice gel et dans une microcapsule	33
<b>Figure II.7.</b> Différents POA générant HO <sup>•</sup> utilisés dans le traitement des effluents liquides	37
<b>Figure II.8.</b> Schéma simplifié des réactions Fenton en milieu acide	41
<b>Figure II.9.</b> Représentation des procédés hybrides de Fenton	44
<b>Figure III.1.</b> Structure chimique de JD 106	50
<b>Figure III.2.</b> Structure chimique de BD 77	51
<b>Figure III.3.</b> Etapes de purification de la C-peroxydase	53
<b>Figure III.4.</b> Protocole d'élution sur gel Sephadex (détermination du poids moléculaire)	56
<b>Figure IV.1:</b> Profil d'élution de l'EEPP sur une résine Sephadex	71
<b>Figure IV.2.</b> Linéarisation du volume d'élution en fonction de logarithme decimal du poids moléculaire	71
<b>Figure IV.3.</b> Variation des AE <sub>rés</sub> de C-peroxydase en fonction du temps	72
<b>Figure IV.4.</b> profil de variation : AE <sub>rés</sub> -pH	73
<b>Figure IV.5.</b> Profil de variation : AE <sub>rés</sub> -température	75
<b>Photo IV.1.</b> Billes de C-peroxydase immobilisée dans les conditions optimales.	77
<b>Figure IV.6.</b> Variation de l'AE <sub>rés</sub> et de TF des billes d'alginate en fonction du temps	78
<b>Figure IV.7.</b> Effet du pH sur la décoloration de JD 106 et BD 77 par la peroxydase libre(a) et immobilisée (b)	79
<b>Figure IV.8.</b> Cinétiques de décoloration de JD 106 par la C-peroxydase libre (a) et immobilisée (b)	81
<b>Figure IV.9.</b> Cinétiques de décoloration de BD 77 par la C-peroxydase libre (a) et immobilisée (b)	82
<b>Figure IV.10.</b> Effet de la température sur la décoloration de JD 106 et BD 77 par la peroxydase libre(a) et immobilisée (b)	83

<b>Figure IV.11.</b> Effet de la concentration initiale du colorant sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b) par la peroxydase libre	84
<b>Figure IV.12.</b> Effet de la concentration initiale du colorant sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b) par la peroxydase immobilisée	85
<b>Figure IV.13.</b> Graphiques en double inverse de Lineweaver et Burk pour les colorants (a) JD 106 et (b) BD 77	86
<b>Figure IV.14.</b> Effet de la concentration du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b) par la C-peroxydase libre	87
<b>Figure IV.15.</b> Effet de la concentration du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b) par la C-peroxydase immobilisée	88
<b>Figure IV.16.</b> Effet de l'AE de la peroxydase libre sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b)	89
<b>Figure IV.17.</b> Effet de l'AE de la peroxydase immobilisée sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b)	90
<b>Figure IV.18.</b> Cinétiques de décoloration par la C-peroxydase libre de (a) JD 106 et (b) BD 77	91
<b>Figure IV.19.</b> Cinétiques de décoloration par la C-peroxydase immobilisée de (a) JD106 et (b) BD77.	92
<b>Figure IV.20.</b> Variation de RD avec le nombre de fois lors de l'utilisation de billes de C-peroxydase : (a) JD106 et (b) BD77	93
<b>Figure IV.21.</b> Spectres UV-visible de la solution initiale (50 mg.L <sup>-1</sup> ) de JD 106 et du surnageant après traitement enzymatique sous conditions optimales	94
<b>Figure IV.22.</b> Spectres UV-visible de la solution initiale (80 mg/L) de BD 77 et du surnageant après traitement enzymatique sous conditions optimales	95
<b>Figure IV.23.</b> Spectre IR du précipité de JD106 récupéré après traitement enzymatique sous conditions optimales	97
<b>Figure IV.24.</b> Spectre IR du précipité de BD77 récupéré après traitement enzymatique sous conditions optimales	98
<b>Figure IV.25.</b> Effet du pH sur le RD par procédé le Fenton, (a) : JD106 et (b) : BD77	101
<b>Figure IV.26.</b> Effet de la concentration initiale de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur le RD de JD 106	102
<b>Figure IV.27.</b> Effet de la concentration initiale de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur le RD de BD 77	103
<b>Figure IV.28.</b> Effet de la concentration initiale de Fe <sup>2+</sup> sur le RD de JD 106	103
<b>Figure IV.29.</b> Effet de la concentration initiale de Fe <sup>2+</sup> sur le RD de BD 77	104
<b>Figure IV.30.</b> Effet de la concentration initiale du JD 106 sur le RD	105
<b>Figure IV.31.</b> Effet de la concentration initiale du BD 77 sur le RD	106
<b>Figure IV.32.</b> Modélisation de cinétique de décoloration de JD 106 par oxydation Fenton	108
<b>Figure IV.33.</b> Modélisation de cinétique de décoloration de BD 77 par oxydation Fenton	108
<b>Figure IV.34.</b> Cinétique de décoloration de JD 106 par traitement Fenton	110
<b>Figure IV.35.</b> Cinétique de décoloration de BD 77 par traitement Fenton	110
<b>Figure IV.36.</b> Spectres UV-visible de la solution initiale de JD 106 et du surnageant après traitement Fenton sous conditions optimales	111
<b>Figure IV.37.</b> Spectres UV-visible de la solution initiale de BD 77 et du surnageant après traitement enzymatique sous conditions optimales	112
<b>Figure IV.38.</b> Spectre IR de précipité récupéré de JD 106 après traitement Fenton sous	

conditions optimales	113
<b>Figure IV.39.</b> Spectre IR de précipité récupéré de BD 77 après traitement Fenton sous conditions optimales	113
<b>Figure IV.40.</b> Variation de RD de JD 106 en fonction de la concentration de $Fe^{2+}$ aux différentes AE pour le couplage séquentiel F-E	117
<b>Figure IV.41.</b> Variation de RD de BD 77 en fonction de la concentration de $Fe^{2+}$ pour différentes AE pour le procédé séquentiel F-E	118
<b>Figure IV.42.</b> Variation de RD de JD 106 en fonction de l'AE pour différentes concentrations de $Fe^{2+}$ par traitement séquentiel E-F	119
<b>Figure IV.43.</b> Variation de RD de BD 77 en fonction de l'AE pour différentes concentrations de $Fe^{2+}$ par couplage séquentiel E-F	120
<b>Figure IV.44.</b> Variation de RD de JD 106 en fonction de la concentration de $Fe^{2+}$ pour différentes AE ; cas du couplage simultanée C-peroxydase libre/Fenton	121
<b>Figure IV.45.</b> Variation de RD de BD 77 en fonction de la concentration de $Fe^{2+}$ pour différentes AE ; cas du couplage simultané C-peroxydase libre/Fenton	122
<b>Figure IV.46.</b> Spectres UV-visible de la solution de JD 106 et les surnageant après les couplages : F-E, E-F et simultané Fenton/peroxydase	123
<b>Figure IV.47.</b> Spectres UV-visible de la solution de BD 77 et les surnageant après les couplages : F-E, E-F et simultané Fenton/peroxydase	123
<b>Photos IV.2.</b> Solutions des colorants aux concentrations initiales et leurs précipités et surnageants après traitement sous conditions optimales par couplage simultané Fenton/peroxydase, (a) : JD 106 et (b) : BD 77	125
<b>Figure IV.48.</b> Spectre IR de précipité de JD 106 récupéré après traitement de couplage simultané Fenton/peroxydase sous conditions optimales	125
<b>Figure IV.49.</b> Spectre IR de précipité de BD 77 récupéré après traitement de couplage simultané Fenton/peroxydase libre sous conditions optimales	126
<b>Figure IV.50.</b> Variation de RD de JD 106 en fonction de la concentration de $Fe^{2+}$ pour différentes AE ; cas du couplage simultané C-peroxydase immobilisée/Fenton	129
<b>Figure IV.51.</b> Variation de RD de BD 77 en fonction de la concentration de $Fe^{2+}$ pour différentes AE ; cas du couplage simultané C-peroxydase immobilisée/Fenton	129
<b>Figure IV.52.</b> Cinétiques de décoloration de : (a) JD 106 et (b) BD 77 par couplage simultané de procédé C-peroxydase libre/Fenton	130
<b>Figure IV.53.</b> Cinétiques de décoloration de : (a) JD 106 et (b) BD 77 par couplage simultané de procédé C-peroxydase immobilisée/Fenton	131
<b>Photos IV.3.</b> Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les solutions des colorants non traitées	134
<b>Photos IV.4.</b> Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les surnageant des colorants traités par procédé enzymatique	134
<b>Photos IV.5.</b> Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les surnageant des colorants traités par procédé Fenton	135
<b>Photos IV.6.</b> Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les surnageant des colorants traités par procédés de couplage simultané	135

## *Liste des tableaux*

<b>Titre du tableau</b>	<b>N° de page</b>
<b>Tableau I.1.</b> Groupes chromophores et classes des colorants	5
<b>Tableau I.2.</b> Longueur d'onde absorbée et couleur de colorant observée	6
<b>Tableau I.3.</b> Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides de l'industrie Textiles	16
<b>Tableau II.1.</b> Principales applications des peroxydases végétales dans le traitement des colorants et effluents textiles	28
<b>Tableau II.2.</b> Méthodes d'immobilisation des enzymes et applications au traitement des colorants et effluents textiles par les peroxydases	32
<b>Tableau II.3.</b> Utilisation de quelques peroxydases immobilisées par inclusion dans le traitement des polluants organiques	34
<b>Tableau II.4.</b> Ions ferriques hydratés en fonction du pH	43
<b>Tableau II.5.</b> Comparaison des principaux procédés alternatifs de traitement des colorants	48
<b>Tableau III.1.</b> Concentrations utilisées pour l'estimation du pH optimal	61
<b>Tableau III.2.</b> Concentrations utilisées pour l'estimation du temps de contact	61
<b>Tableau III.3.</b> Conditions opératoires utilisées pour l'étude de l'effet de concentration initiale de colorant	62
<b>Tableau III.4.</b> Valeurs de concentration initiale de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> utilisée dans le procédé de traitement enzymatique	63
<b>Tableau III.5.</b> Valeurs d'AE utilisées dans le procédé de traitement enzymatique	63
<b>Tableau III.6.</b> AE et concentrations de Fe <sup>2+</sup> utilisées pour le traitement séquentiel F-E	67
<b>Tableau III.7.</b> AE et concentrations de Fe <sup>2+</sup> utilisées pour le traitement séquentiel : E-F	67
<b>Tableau III.8.</b> AE et concentrations de Fe <sup>2+</sup> utilisées pour le traitement simultané : C-peroxydase libre-Fenton	68
<b>Tableau III.9.</b> Concentrations utilisées pour le procédé de combinaison simultanée : C-peroxydase immobilisée-Fenton	68
<b>Tableau IV.1.</b> Résultats de purification de la peroxydase de <i>Cucurbita pepo</i>	70
<b>Tableau IV.2.</b> Effet de la présence des cations métalliques sur l'AE	74
<b>Tableau IV.3.</b> Détermination des paramètres : EI, AEI, AR et TF des billes d'alginate obtenues sous différents conditions d'immobilisation	76
<b>Tableau IV.4.</b> Paramètres cinétiques des colorants déterminés à partir de l'équation de Lineweaver et Burk	86
<b>Tableau IV.5.</b> Récapitulation des valeurs optimales des paramètres optimisés pour le traitement de JD 106 et de BD 77 par la C-peroxydase libre et immobilisée	91
<b>Tableau IV.6.</b> TA et TI des différents effecteurs de la C-peroxydase libre vis-à-vis le JD 106 et le BD 77	92
<b>Tableau IV.7.</b> Paramètres des modèles cinétiques d'ordre 1 et d'ordre 2 et coefficients de corrélation pour la décoloration de JD 106 par traitement Fenton	107
<b>Tableau IV.8.</b> Paramètres des modèles cinétiques d'ordre 1 et d'ordre 2 et coefficients de corrélation pour la décoloration de BD 77 par traitement Fenton	107
<b>Tableau IV.9.</b> Paramètres du modèle cinétique de Behnajady et al. et coefficients de corrélation pour la décoloration par traitement Fenton	109
<b>Tableau IV.10.</b> Conditions optimales du traitement des colorants JD 106 et BD 77 par le procédé Fenton	109

<b>Tableau IV.11.</b> Valeurs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dosées après traitement Fenton	116
<b>Tableau IV.12.</b> Valeurs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dosées après traitement enzymatique	118
<b>Tableau IV.13.</b> Valeurs de temps de rétention et de surface des pics du JD 106 et ses produits de transformation par différents procédés appliqués	127
<b>Tableau IV.14.</b> Valeurs de temps de rétention et de surfaces des pics du BD 77 et ses produits de transformation par différents procédés appliqués	127
<b>Tableau IV.15.</b> Test de phytotoxicité de JD 106 et leurs surnageant issus des différents procédés de traitement	132
<b>Tableau IV.16.</b> Test de phytotoxicité de BD 77 et leurs surnageant de différents issus des procédés de traitement	132

## Abréviations et symboles

Symbole	Désignation	Unité
AE	Activité enzymatique	UI.ml <sup>-1</sup>
AEI	Activité enzymatique de la peroxydase immobilisée	UI.g <sup>-1</sup>
AS	Activité enzymatique spécifique	UI.mg <sup>-1</sup>
AT	Activité totale	UI
AR	Activité retenue	%
AE <sub>rés</sub>	Activité enzymatique résiduelle	%
b	Constante du modèle cinétique	1
BD 77	Bleu disperse 77	
BGP	Bitter gourd peroxidase	
C	Concentration molaire ou massique	mg.L <sup>-1</sup> ou mol.L <sup>-1</sup>
CAR/PP	Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre	
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance	
C-peroxydase	Peroxydase de <i>Cucurbita pepo</i>	
COT	Carbone organique total	mg.L <sup>-1</sup>
CLEA	Cross-linking enzyme aggregates	
DBO <sub>5</sub>	Demande Biochimique en Oxygène	mg.L <sup>-1</sup>
DCO	Demande Chimique en Oxygène	mg.L <sup>-1</sup>
DO	Densité optique	
E	Enzyme	
EEB	Extrait enzymatique brut	
EEPP	Extrait enzymatique partiellement purifié	
EI	Efficacité d'immobilisation	%
F	Fenton	
FP	Facteur de purification	
HRP	Horseradish peroxidase (peroxydase de raifort)	
IRTF	Infra rouge à transformé de Fourier	
IG	Indice de germination	%
JD 106	Jaune direct 106	
k	Constante de réaction	
K <sub>aff</sub>	Constante d'affinité	L.mol <sup>-1</sup>
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis et Menten	mg.L <sup>-1</sup>
LRR	Longueur relative des racines	%
L <sub>moy</sub>	Longueur moyenne des tiges	cm
m	Constante du modèle cinétique	min
MES	Matière en suspension	mg.L <sup>-1</sup>
n	Ordre de la réaction	
PG	Pourcentage de germination	%
PM	poids moléculaire	kDa
POA	Procédés d'oxydation avancée	
R <sup>2</sup>	Coefficient de corrélation	1
R•	Radical	
RD	Rendement de décoloration	%
RP	Rendement de purification	%

SAB	Sérum albumine bovin	
S <sub>0</sub>	Substrat	
t	Temps	s
TA	Taux d'activation	%
TF	Taux de fuite	%
TI	Taux d'inhibition	%
UI	Unité internationale	μmol.min <sup>-1</sup>
UV	Ultra-violet	
US	Ultra-son	
VID	Vitesse initiale de décoloration	mg.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>
V <sub>M</sub>	Vitesse maximale de réaction enzymatique	mg.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>

### Symboles Grecs

		Unité
λ	Longueur d'onde	nm
ν	Fréquence de lumière	s <sup>-1</sup>
ε	Coefficient d'extinction molaire	cm <sup>2</sup> .mol <sup>-1</sup>

# INTRODUCTION GENERALE

---

Le plus grand danger pour l'environnement et la dégradation des écosystèmes est la pollution des eaux. Quelle soit accidentelle ou volontaire, cette pollution est le résultat de l'utilisation massive de polluants organiques et minéraux d'origine agricole, urbaine et industrielle. Ainsi, l'industrie textile en particulier, constitue une source importante des effluents liquides chargés de polluants à cause du grand volume d'eau et de substances colorantes et non colorantes utilisées au cours des opérations d'impression, de teinture et de finissage. De plus, il a été estimé que  $28.10^4$  tonnes de colorants textiles sont rejetés annuellement à l'environnement dans le monde. Les effluents contenant ces colorants sont hautement colorés, ce qui rend la couleur le premier contaminant des effluents [1]. Les colorants synthétiques employés dans l'industrie textile dont la plus grande partie est constituée de colorants azoïques et anthraquinoniques (65-75% des colorants), représentent ce type de contaminants [2].

La nécessité de les transformer avant leurs rejets dans les écosystèmes, est assurée par leur élimination par clivage des groupements chromophores ou par transformation des cycles aromatiques [3].

Actuellement, les procédés disponibles sont divers : classiques et alternatifs. En général, les procédés conventionnels sont classés comme traitements : physiques, chimiques et biologiques. L'incapacité de ces procédés réside dans la transformation inefficace des molécules réfractaires ou toxiques et dans la production d'une nouvelle pollution [4].

Face à ce problème, de nouveaux procédés servant à éliminer plusieurs produits est la preuve que de nouveaux systèmes efficaces de traitement sont nécessaires.

Le développement des méthodes enzymatiques est devenu de plus en plus attractif, due aux avantages qu'elles présentent. Les enzymes oxydoréductase ont prouvé leurs potentialité de transformer les molécules de différentes structures à cause de l'action catalytique élevée et sélective et une grande stéréo spécificité dans des conditions douces comparée aux catalyseurs chimiques [5-8]. Ainsi, d'autres avantages présentant ces enzymes résident dans une basse énergie, et un procédé facilement contrôlable pouvant s'opérer dans un large intervalle de température et de pH et aux concentrations de colorant.

En effet, les peroxydases occupent une place importante des enzymes oxydoréductases. Elles exercent leur action en présence de peroxyde d'hydrogène et génèrent à travers un cycle catalytique des radicaux libres très réactifs entrant dans une série de réactions complexes de clivage et de transformation spontanées [9].

Parmi les peroxydases d'application environnementales : les peroxydases sécrétrices des végétaux, dont l'activité enzymatique est surtout estimée à partir de radis, de navet, de courgette, de grains de soja, de chou-fleur, et d'orange,...Le choix de la peroxydase est basé sur sa stabilité, son activité de conversion et la précipitation des substrats en produits pouvant être éliminés facilement du milieu réactionnel [5, 10]. Cependant, les propriétés catalytiques élevées particulièrement sur un grand nombre de colorants azoïques, permettent de générer des produits aromatiques tels que les amines aromatiques [11,12]. explorer

En outre, les procédés récents de traitement des colorants, tels que ceux d'oxydation avancée apportent une solution efficace. Ces procédés permettent une décoloration et une minéralisation partielle ou complète en milieu aqueux des molécules organiques toxiques pour l'homme et pour l'environnement par la formation de radicaux extrêmement réactifs et non sélectifs : les radicaux hydroxyle. Parmi les procédés d'oxydation avancée producteurs des radicaux hydroxyle, on cite le procédé Fenton qui met en jeu un catalyseur (cations ferreux) et le peroxyde d'hydrogène, en milieu acide [13, 14].

Ainsi, des recherches ont montré que l'application du procédé Fenton sur quelques colorants azoïques peut conduire à la formation des produits toxiques et à la génération d'une autre forme de pollution. Face à cette situation, des tentatives de couplage aux procédés biologiques permettant une minéralisation des colorants azoïques a attiré l'attention des chercheurs [15, 16].

Cependant, les procédés biologiques sont appliqués soit en amont ou en aval de procédé Fenton, et peuvent être inefficaces surtout envers les molécules non biodégradables. Ainsi, ils peuvent présenter l'inconvénient de nécessité de contrôle donc plus coûteux [17, 18].

Dans ce contexte, les méthodes alternatives ciblées dans la présente étude, apparaissent comme méthodes intéressantes appliquées soit individuellement ou combinées.

L'objectif de ce travail est, en premier lieu d'examiner l'application de la peroxydase extraite de courgette et est utilisée sous forme libre et immobilisée sur des solutions synthétiques de colorants appliqués en industrie textile algérienne: jaune direct 106 (colorant azoïque) et bleu disperse 77 (colorant anthraquinonique), où une optimisation des paramètres de décoloration a été faite. En deuxième lieu, le procédé d'oxydation Fenton est appliqué sur les solutions de ces colorants. En troisième lieu, des expériences de couplage de la méthode enzymatique et de la méthode chimique sur les colorants ciblés, en modes séquentiel et simultané seront effectuées.

Ce manuscrit se compose en deux parties. Dans la première, une synthèse bibliographique résumera les différents colorants utilisés en industrie textile, où les colorants azoïques et anthraquinoniques seront détaillés. La problématique de la contamination des ressources en eau par les polluants de l'industrie du textile sera suivie d'une présentation des différents procédés de traitement depuis les méthodes classiques à celles alternatives (enzymatique, et Fenton).

La deuxième partie sera divisée en deux chapitres, dont le premier sera réservé aux matériel et méthodes utilisés lors des expérimentations. Une attention particulière sera portée sur les modes opératoires traitant la caractérisation de la peroxydase et son application sur les colorants.

Le dernier chapitre vise à étudier, d'une part, la décoloration des composés ciblés par voie enzymatique : peroxydase libre et après immobilisation dans des matrices polymériques d'alginate de calcium obtenus après optimisation des concentrations d'agents d'immobilisation et d'enzyme.

D'autre part, la décoloration des molécules choisies par la réaction Fenton, concerne l'étude des effets de pH, des concentrations des réactifs Fenton et celle du colorant.

Dans chaque procédé appliqué, une étude cinétique de transformation de chacune des molécules sera mise en jeu.

Dans une dernière étape, une faisabilité du couplage d'un procédé d'oxydation avancée et d'un traitement enzymatique sous les deux formes libre et immobilisée sera réalisée.

Tous les surnageants et les précipités produits à partir des différents procédés seront analysés par UV-visible, par IRTF et par CLHP. La phytotoxicité des surnageants sera testée sur les grains d'haricots.

La thèse se termine par une conclusion générale qui rassemble les résultats obtenus durant cette étude et trace les perspectives qui pourront être envisagées pour le futur.

# CHAPITRE I

---

## Colorants textiles

## **I.1. Généralités sur les colorants**

### ***I.1.1. Introduction***

Les colorants furent, pendant très longtemps, extraits du milieu naturel : plantes (garance, gaude, indigo..., animaux (cochenille, murex..) et minéraux [19].

Les colorants synthétiques ont progressivement supplanté les colorants naturels. Les recherches, menées depuis le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, ont débouché sur la fabrication de très nombreuses familles de colorants, où l'on trouve souvent des imitations de la structure chimique des colorants naturels. Cette recherche a joué également un rôle important dans l'essor de la chimie organique et dans la compréhension de la nature des molécules [20, 21].

La mauvéine, le premier colorant de synthèse, a été découverte par hasard par William Henry Perkin en 1856. Elle a été obtenue à partir de l'aniline par action de l'acide sulfurique en présence de bicarbonate de potassium et a permis de teindre la soie en violet. Les premiers colorants de type azoïques furent découverts en 1860.

Un colorant est une substance qui possède deux propriétés spécifiques, indépendantes l'une de l'autre, la couleur et l'aptitude à être fixée sur un support tel qu'une fibre. Cette dernière propriété est à l'origine résulte de l'interaction entre la molécule du colorant et le substrat à teindre. Ainsi, cette interaction se forme entre la partie réactive de la molécule colorante et la molécule à teindre par formation d'une liaison sélective [22-24].

Cependant, les colorants se distinguent des pigments : les premiers sont solubles dans le bain de teinture (aqueux) tandis que les derniers sont insolubles, ils sont mis en suspension dans un liant organique. Les deux groupes se regroupent dans la famille des matières colorantes [22, 25].

### ***I.1.2. Couleur et structure chimique***

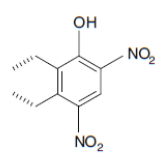
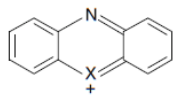
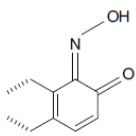
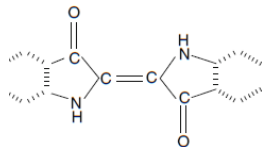
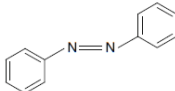
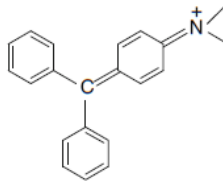
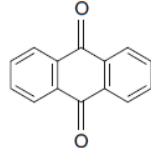
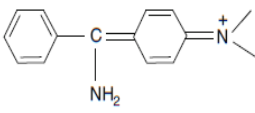
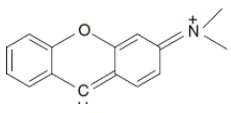
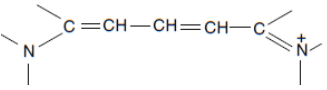
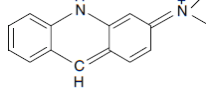
Les matières colorantes sont des composés qui absorbent l'énergie électromagnétique dans le spectre du visible (380 à 750 nm). La transformation de la lumière blanche en lumière colorée par réflexion sur un corps, ou par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés groupes chromophores (site actif du colorant est le chromophore, il peut se résumer à la localisation spatiale des atomes absorbant l'énergie lumineuse). Ces groupes comportent généralement des hétéroatomes (N, O..) [26]. Le groupe responsable de l'interaction avec le substrat à teindre est un

auxochrome, qui rehaussant la coloration et dont les doublets libres participent également au système conjugué entraînant ainsi un déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde [23,26].

De manière générale, les colorants consistent en un assemblage de groupes chromophores, auxochromes et de structures aromatiques conjuguées (cycles benzéniques, anthracène, perylène, etc.). Parmi les groupes auxochromes les plus importants :  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{NHR}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{OH}$  et  $-\text{OCH}_3$  [26-28]. Par conséquent, la coloration et l'intensité de couleur, les propriétés et l'application des colorants sont liées à leur constitution chimique [29].

Les principaux groupes chromophores sont détaillés dans le tableau I.1.

**Tableau I.1.** Groupes chromophores et classes des colorants [30]

Groupes chromophores	Classe du colorant	Groupe chromophore	Classe du colorant
	Nitro		Quinoneimines
	Nitroso		Indigoides
	Azo		Triphénylméthane
	Anthraquinones		Diphénylméthane
	Xanthènes		Cyanines
	Acridines		

Plus précisément, le terme chromophore désigne le groupement d'atomes au sein de cette molécule qui est responsable de la couleur. Cette propriété optique résulte d'une capacité à absorber l'énergie des photons dans une gamme du spectre visible tandis que les autres longueurs d'onde sont réfléchies. Par exemple, le carotène est le chromophore qui donne

leur couleur à de nombreux fruits (comme les carottes), cette molécule absorbe en effet les longueurs d'onde dans la gamme bleue du spectre visible mais réfléchit les longueurs d'ondes inférieures (orange et rouge). Un produit contenant du carotène nous apparaît donc orange ou rouge [31]. Le tableau I.2, montre la relation entre la longueur d'onde absorbée et la couleur observée.

Les deux principaux types de chromophores sont :

- Les systèmes à liaisons  $\pi$  conjuguées : La présence d'une séquence suffisamment longue de doubles liaisons conjuguées dans une molécule organique crée un nuage électronique délocalisé pouvant entrer en résonance avec le rayonnement incident [14,31].

Exemples :  $\beta$ -carotène, anthocyanine, rétinol.

- Les complexes métalliques autour d'un métal de transition : Les orbitales d de l'atome métallique sont réparties entre celui-ci et le ligand. L'absorption d'un photon incident se traduit par un saut d'un électron vers une orbitale supérieure. On retrouve ce type de chromophores aussi bien dans des molécules biologiques (chlorophylle, hémoglobine, hémocyanine) que dans des matériaux inorganiques (améthyste, malachite) [29].

### *1.1.3. Classification des colorants textiles*

Les colorants sont des molécules organiques insaturées qui possèdent une affinité pour les fibres sur lesquels sont appliquées. Ces interactions peuvent être de nature physique ou chimique.

Les matières colorantes peuvent être classées selon plusieurs voies, dont en application textiles deux sont utilisées : d'après leur structure chimique ou selon leur méthode d'application (classes tinctoriales) [5, 30, 32].

**Tableau I.2.** Longueur d'onde absorbée et couleur du colorant observée [22].

Longueur d'onde (nm)	Couleur absorbée	Couleur observée
400–435	Violet	jaune vert
435–480	Bleu	Jaune
480–490	Vert-bleu	Orange
490–500	Bleu-vert	Rouge
500–560	Vert	Rose
560–580	Jaune-vert	Violet
580–595	Jaune	Bleu
595–605	Orange	Vert-bleu
605–700	Rouge	Bleu-vert

L'ouvrage de référence en termes de colorants et pigments est le Colour Index (CI), publié par la Society of Dyers and Colourists. Il se décline en différents volumes et fait l'objet d'une mise à jour régulière. Deux systèmes de nomenclature sont indiqués par le CI : Un nom générique (C.I. Generic Name) y est attribué à chaque colorant, incorporant sa classe d'application ainsi qu'un nombre de cinq chiffres, relatif à sa structure chimique (C.I. Number). Le second système est le (C.I name), il indique la classe chimique, la couleur et un nombre d'identification. Ce système de nomenclature est relativement universel et permet une compréhension simplifiée au sein d'un milieu complexe de noms commerciaux historiques et modernes. Chaque colorant fait également référence à des propriétés tinctoriales et à divers fabricants [31,33].

Le classement du CI des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du groupe chromophore, il dénombre 17 classes dont les principaux sont présentés dans le tableau I.1. Cette classification présente un intérêt pour le fabricant des matières colorantes, selon laquelle, les plus importantes sont représentées par les colorants azoïques et les colorants anthraquinoniques, les autres se résument dans les indigoïdes, les xantènes, les phtalocyanines, les nitrés et nitrosés [33].

La classification tinctoriale se révèle fort utile pour les coloristes dont le rôle est de teindre un textile particulier avec la plus grande efficacité. Au sein de chaque classe, les molécules de colorants démontrent une affinité accrue pour un type de fibres et des propriétés tinctoriales définies. Les fibres de cellulose peuvent être teintées avec une grande variété de colorants, parmi les classes tinctoriales suivantes : colorants directs et dispersés.

Le Color Index a enregistré 15 classes des colorants selon le mode d'application [5, 32].

Selon la classification tinctoriale, on distingue outre les colorants directs et dispersés : les colorants à mordant, acides, métallifères, cationiques, au soufre, de cuve, réactifs, plastosolubles et azoïques insolubles.

## **I.2. Colorants azoïques**

Les colorants azoïques sont des composés aromatiques, contenant un groupement azoïque (-N=N-) ou plus (colorant diazoïques, triazoïques.. polyazoïques), ces colorants constituent la plus large classe des colorants synthétiques utilisés dans les applications commerciales. En 1994, la production mondiale en colorants a dépassée 1 million tonnes, dans laquelle plus de 50% sont des colorants azoïques. Ces derniers, trouvent plusieurs applications dans différents domaines: textile, alimentaire, cosmétique, papetière etc. [34].

Le dosage du groupement chromophore (groupement azoïque) se fait par plusieurs méthodes analytiques : par colorimétrie, spectrophotométrie ou spectrofluorométrie.

Cependant, les composés azoïques, sont des composés analytiques utilisés comme des indicateurs de pH et des indicateurs de complexométrie. De même, les composés azoïques ont montré plusieurs activités biologiques, antibactériennes, antifongiques, pesticides, antivirale et anti-inflammatoire [35].

Le groupement azoïque, peut unir deux groupements alkyl ou aryle  $A-N$  identique ou différents. Les aryles sont en position *trans* dans laquelle  $N-E$ . L'atome d'azote est hybridé en  $sp^2$ , et la désignation des groupes est: A et E selon l'application C.I. Pour les colorants mono azoïques, le groupe A est un accepteur d'électrons tandis que le groupe E est un donneur d'électrons (groupes hydroxyles et amines) [32], ce qui a un effet bathochrome. De même, la multiplication des groupes azoïques, peut donner presque toutes les nuances du spectre. La présence dans un tel édifice de substituants sulfonés, nitrés ou halogénés, accepteurs ou donneurs d'électrons  $\sigma$  ou  $\pi$  délocalisables sur le(s) cycle(s) aromatique(s), permet d'augmenter le phénomène de résonance. C'est ainsi que dépend la couleur et les qualités de teinture [36].

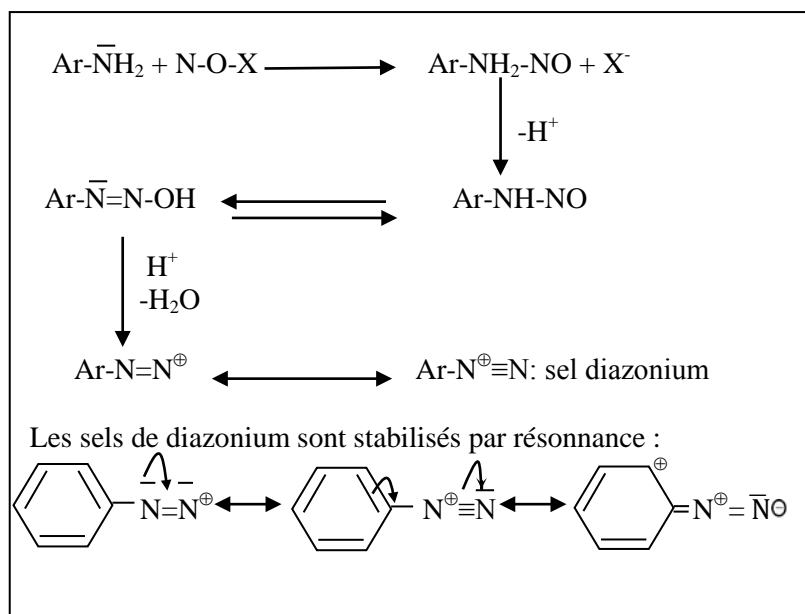
Ainsi, les colorants azoïques se rencontrent dans diverses classes tinctoriales : colorants basiques, acides, directs et réactifs solubles dans l'eau, dispersés et à mordant non ioniques insolubles dans l'eau.

### ***1.2.1. Synthèse des colorants azoïques***

La préparation générale des colorants azoïques comporte une réaction de diazotation des amines primaires suivit d'une copulation du sel diazonium obtenu sur un phénol ou une amine [37].

#### **A. Diazotation**

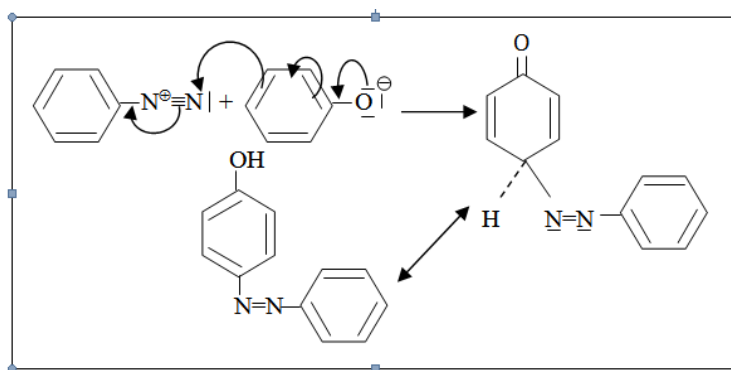
La facilité de diazotation des amines aromatiques dépend de leur basicité qui, est fonction de la nature et de la position des substituants présents sur le noyau. Le principe de la réaction de diazotation est basé sur l'introduction d'un atome d'azote par réaction de l'un des réactifs :  $HNO_2$ ,  $NaNO_2$ ,  $NOX$  ou  $N_2O_3$  sur une amine en milieu acide et aqueux selon la réaction du schéma de la figure I.1:



**Figure I.1.** Réactions de diazotation [38]

### B. Copulation

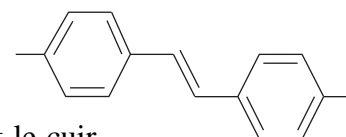
La réaction de condensation ou de copulation consiste en la réaction de diazonium avec un phénol ou une amine aromatique, pour que la réaction de copulation ait lieu, les groupes électro-donneurs puissants tels que : -OH, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, doivent être présents dans le système aromatique du copulant, ainsi, l'attaque est favorisée sur l'atome de carbone en position para et le mécanisme peut être représenté comme selon la réaction, de la figure I.2. [37, 38].



**Figure I.2.** Réaction de copulation du diazonium avec le phénol [38]

### C. Colorants stilbeniques

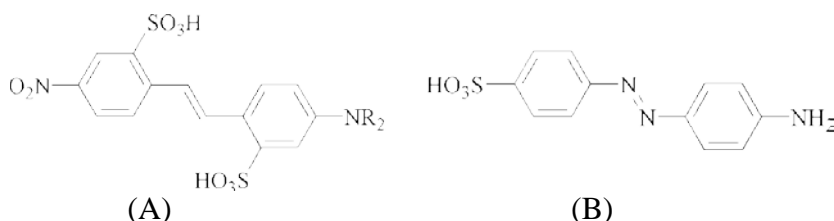
Leurs chromophores caractéristiques sont les groupes azo- ou azoxystilbenes. La plupart des colorants stilbenes servent de colorants directs jaune à brun pour les fibres cellulosiques et le cuir.



Ils résultent d'une auto-condensation alcaline de l'acide 4-nitrotoluène-2-sulfonique, ou

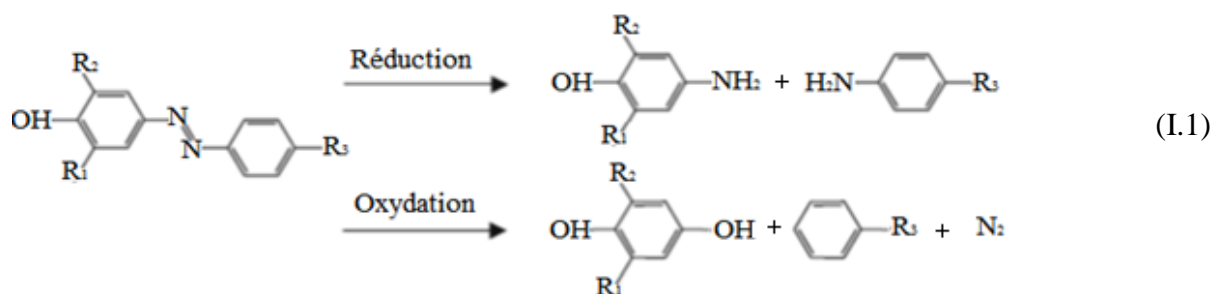
son produit de condensation initial l'acide 4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulfonique, soit seuls ou avec les arylamines [39].

L'exemple de condensation de l'acide nitrostilbene sulfonique (A) avec un aminoazobenzène (B) produit un colorant stilbene : C.I. Orange direct 34 [32].

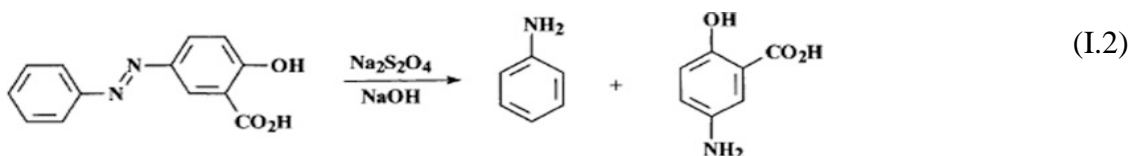


### 1.2.2. Transformation des colorants azoïques

Dans un colorant azoïque, la fonction azo est considérée la partie la plus labile. La transformation peut se faire par voie chimique, enzymatique, thermique ou photochimique. Cependant, la dégradation des colorants azoïques peut être obtenue par réduction ou par oxydation. Les réactions d'oxydation ou de réduction des colorants azoïques peuvent être assurées par les enzymes oxydoréductases et azoréductases respectivement (réaction I.1), ou en présence des agents chimiques (réaction I.2) [40, 41].



La réduction chimique des composés azoïques se fait en présence de l'un des réactifs suivants :  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{Na}_2\text{S}$  ou  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (Réaction I.2) [31] :

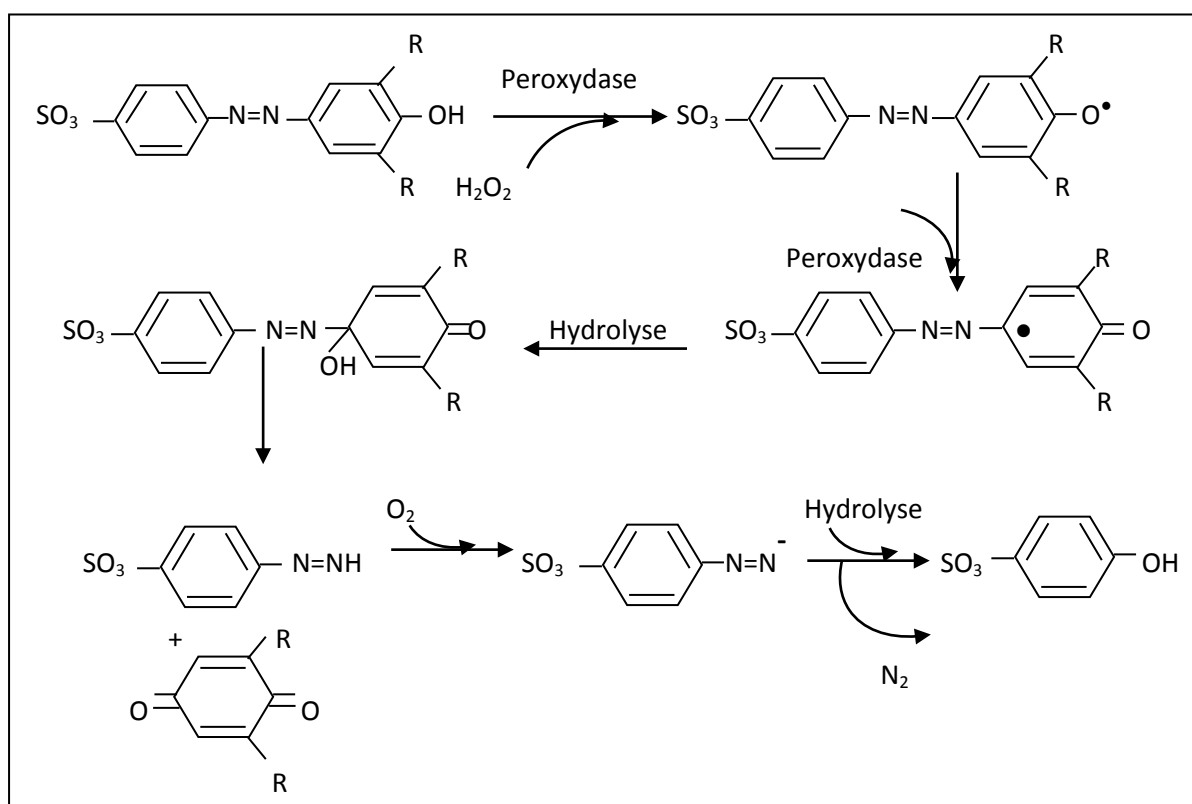


La réduction des colorants azoïques libère les amines aromatiques primaires incolores [42-45].

Ainsi, les réactions de réduction par voie enzymatique peuvent être assurées par voie directe ou indirecte (enzymes bactériennes, fongiques,...) [30, 44-46]. En ce qui concerne l'oxydation chimique, les composés à base de chlore ( $\text{Cl}_2$  ou  $\text{NaOCl}$  par exemple) réagissent fortement et en milieu acide avec le groupement azo [47]. Tandis que l'oxydation enzymatique implique les peroxydases et les laccases [41].

Le mécanisme d'oxydation chimique et enzymatique est difficile d'établir à cause de la haute réactivité des radicaux libres formés au cours du processus de dégradation. Selon Chivukula et Renganathan (1995) [41], l'oxydation commence par l'abstraction successive de deux électrons de la molécule du colorant suivie d'une attaque nucléophile de l'azote résulte de la formation d'un cation radicalaire instable. Par conséquent, le résultat de l'oxydation des colorants azoïques conduit aux produits susceptibles en une hydrolyse et l'azote s'élimine sous forme moléculaire.

De plus, les travaux réalisés sur l'oxydation des colorants azoïques sulfonés par la peroxydase ou par la laccase, montrent que le clivage peut être asymétrique (figure I.3) ou symétrique [41, 48-53]. Le dernier mécanisme conduit à la détoxification des colorants azoïques où aucune amine aromatique n'est formée [6].



**Figure I.3.** Mécanisme simplifié d'oxydation asymétrique d'un colorant azoïque [54]

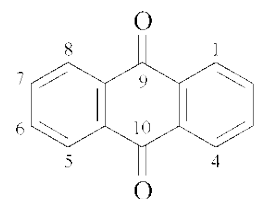
### I.3. Colorants anthraquinoniques

Ces colorants constituent la deuxième classe de colorants commerciaux (15% des colorants synthétiques) [32].

La structure des colorants est basée sur le noyau anthraquinone 9,10.

Qui présente le groupe chromophore carbonyle :  $>C=O$  sur un noyau quinonique qui est le chromogène. Avec leurs large gamme de nuances (toutes les couleurs du spectre du visible) mais particulièrement bleue

et turquoise, les colorants anthraquinoniques complètent les colorants azoïques jaunes, orange et rouges [55]. En effet, ils constituent la classe des colorants présentant la plupart du temps les meilleures stabilités à la lumière et aux agents chimiques [23]. Ces produits sont utilisés pour la coloration des fibres polyester, acétate et triacétate de cellulose.

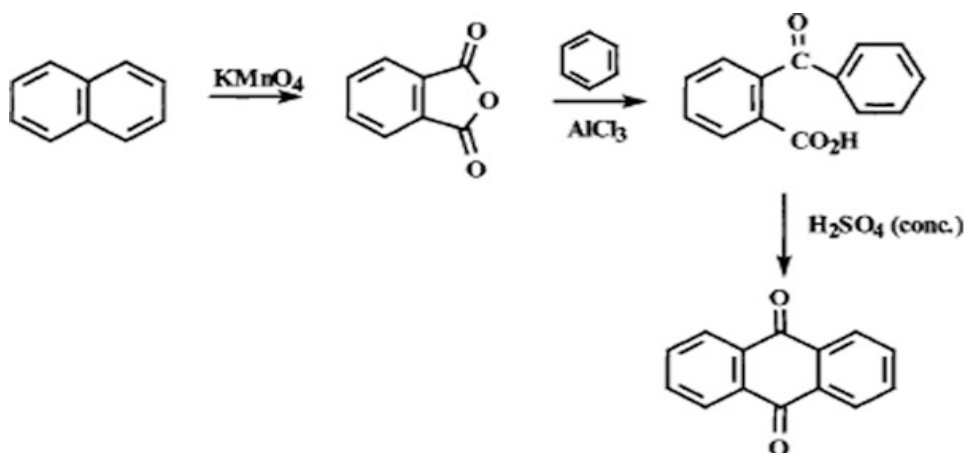


#### I.3.1. Synthèse des colorants anthraquinoniques

L'anthraquinone est de couleur jaune pâle, c'est l'introduction de substituants qui permet l'obtention des couleurs : orange, rouge brun, vert et bleu.. [32].

La synthèse des colorants anthraquinoniques commence par la synthèse de l'anthraquinone proprement dit. À cet égard, la synthèse en trois étapes comprend:

- (1) *l'oxydation de naphthalène* en anhydride phtalique, (2) *l'acylation de Friedel-Crafts* de benzène pour obtenir un acide cétonique, et (3) *la cyclodéshydratation* en présence de  $H_2SO_4$ . (voir figure I.4) [31].

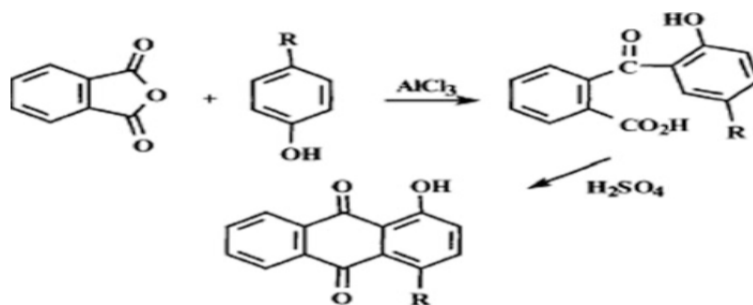


**Figure I.4.** Synthèse d'un noyau anthraquinonique [31]

La production des colorants est obtenue par substitution sélective des hydrogènes des noyaux aromatiques de cette molécule. Ils sont synthétisés par substitution d'atomes

d'hydrogènes en position  $\alpha$  (1, 4, 5 et 8) par les groupements hydroxyles (-OH) ou amino (-NH<sub>2</sub>). Ainsi, ces substitutions peuvent s'effectuer simultanément sur les carbones : 1,4 ; 1,2,4 et 1, 4, 5, 8. La force des groupements donneurs d'électrons s'accroît dans l'ordre OH < NH<sub>2</sub> < NHR < HNAr. On obtient des composés de toutes les teintes selon le groupement substituant et le(s) carbone(s) de substitution [32].

Un exemple de préparation directe des colorants anthraquinones disubstitués 1,4 - utilise des intermédiaires comme l'indique la figure I.5.



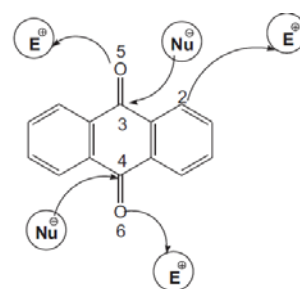
**Figure I.5.** Mécanisme de synthèse d'un colorant anthraquinonique disubstitué 1-4 [31]

Du point de vue application, les colorants anthraquinoniques bleu et turquoise présentent des meilleures résistances contre les réactions d'oxydation et de réduction. Cette classe est exclusivement utilisée dans le domaine de l'industrie textile, et dans pratiquement toutes les catégories tinctoriales [55, 56].

### 1.3.2. Transformation des colorants anthraquinoniques

Dans la littérature, et contrairement aux colorants azoïques, il y a très peu d'études détaillant les transformations des colorants anthraquinoniques [57, 58]. Cependant, l'examen de l'anthraquinone permet de cibler les attaques aux niveaux de plusieurs sites (voir structure ci-contre). Ainsi, les groupements substituants en différentes positions sont aussi sujet des attaques chimiques et photolytiques [57- 59].

Malgré qu'ils résistent aux attaques microbiennes, les colorants anthraquinoniques peuvent être transformé par les enzymes oxydatives en différents métabolites généralement des acides carboxyliques aromatiques [60-64].



#### I.4. Toxicité des colorants azoïques et anthraquinoniques

Ces deux classes de colorants sont xnébiotiques et récalcitrants, ils présentent des effets toxiques : létales, génotoxiques, multigéniques et cancérigènes pour les organismes aquatiques, les animaux, les plantes, et l'homme. Cependant, les effets potentiels toxiques à l'homme et à l'environnement résultant de l'exposition aux colorants et/ou leurs métabolites ne sont pas des études récentes. Depuis 1895, plusieurs études ont montrés le potentiel toxique des colorants azoïques [65-68].

En effet, des problèmes de santé très sévères ont été causés par la plupart des colorants azoïques, l'exposition prolongée provoque des problèmes d'allergie cutanée et pulmonaire et de grave problème des cancers cutanés et de la vessie [69].

De plus, les colorants azoïques sont suspectés être cancérigènes et mutagènes, beaucoup plus par la formation des amines aromatiques potentiellement cancérigènes, issus surtout de la réduction de ces colorants azoïques sous l'effet de biodégradation anaérobie par les bactéries gastro-intestinales des mammifères. Selon l'EPA, l'estimation des risques de cancer impose de fixer une concentration limite de  $3,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  en colorant azoïque dans l'eau potable [70].

Ainsi, La toxicité des colorants azoïques est accrue par la nature et la position des substituants sur le noyau aromatique notamment des groupes nitro ( $-\text{NO}_2$ ) et halogènes (particulièrement Cl). Cependant, la substitution avec des groupes carboxyliques ou sulfonates diminue la toxicité [71]. Des travaux de recherche faisant l'objet d'étude de l'effet mutagénique et cancérigène des amines aromatiques sulfonées, ont montré qu'ils ne présentent aucun ou un très faible effet génotoxique et cancérigène, contrairement à leurs analogues non sulfonés [72].

Les colorants anthraquinoniques sont les colorants les plus résistant à la dégradation à cause de leur structure aromatique spéciale ce qui leur confère une meilleure stabilité de la couleur au cours du temps [47, 73].

Au cours de la production des colorants anthraquinoniques, des réactions allergiques, asthme quelquefois et surtout des dermites eczémateuses ont été observés avec divers colorants aminés anthraquinoniques [74]. A cet effet, des risques mutagéniques signifiant sur le système nerveux central voire un effet cancérigène mortel de l'homme sont provoqués par quelques colorants anthraquinoniques [75, 76].

De plus, les colorants de la famille 2-aminoanthraquinone sont cancerigènes et mutagènes à l'homme comme ils sont irritants pour la peau, les yeux et le système respiratoire.

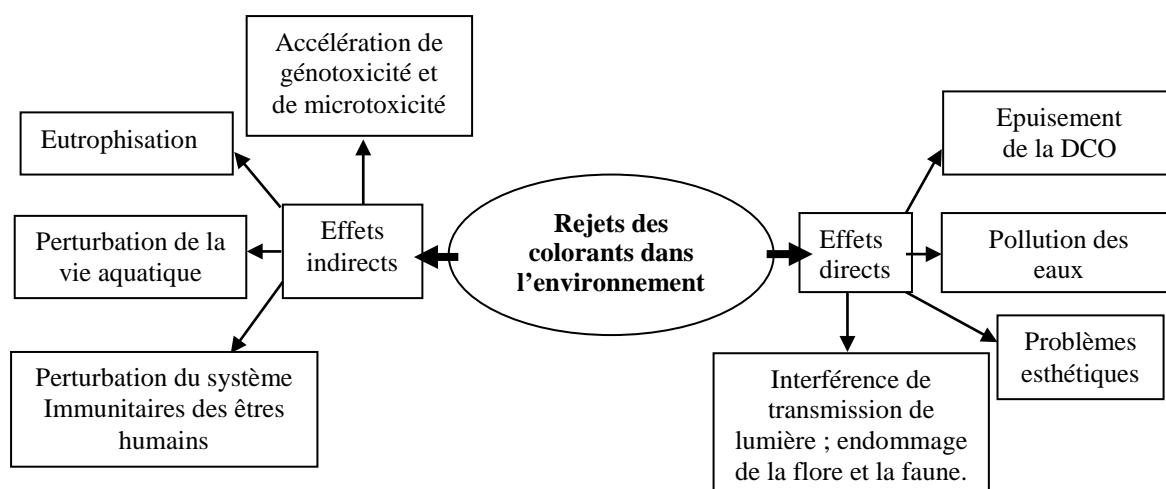
Des études ont montré que le rouge disperse 15 est très toxique pour les bactéries, les algues, et les protozoaires en provoquant des effets mutagéniques. Ainsi, il est très résistant aux différents modes de dégradation par existence de structures aromatiques ce qui leur confère une couleur persistante [77].

L'absorption des anthraquinones par les rats conduit en leur métabolisme en 1-hydroxy- et 2-hydroxyanthraquinone, le premier provoque le cancer d'estomac, de l'intestin et du foie et le deuxième est mutagénique [78].

### **I.5. Pollution engendrée par les colorants textiles et leurs détections**

En vue de leur production à grande échelle (plus de  $10^5$  de colorants et plus d'un million de tonnes sont produits annuellement) et de leur application très répandue, ils sont à l'origine d'une pollution environnementale considérable et représentent un facteur de risque très sérieux pour la santé publique. En effet, au cours des différentes étapes de teintures, une bonne quantité de colorants (2% pour les colorants basique à 50% pour les colorants réactifs) est perdue, par manque d'affinité avec les surfaces à teindre [2], représentant ainsi une source de pollution esthétique (certains colorants sont visibles en solution à une concentration inférieure à  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) [5, 54] et de phénomène d'eutrophisation et de perturbation du milieu aquatique [8,79].

L'industrie textile est parmi les industries anciennes et technologiquement complexes dans le monde, cette industrie utilise un grand volume en eau et en matières colorantes [2]. Cependant, les effluents textiles sont classés parmi les effluents les plus pollués dans les différents secteurs [80]. Ce sont des mélanges complexes contenant plusieurs substances polluantes : colorants, métaux lourds, et des additives chimiques utilisés au cours des opérations de teinture et d'impression [2, 81]. Ces composés sont caractérisés par une très bonne stabilité à la lumière, à la température, aux détergents et aux attaques chimiques et microbiologiques [14, 80, 82]. Les différents impacts environnementaux provoqués par les colorants sont schématisés sur la figure I.6.



**Figure I.6.** Représentation schématique des effets des effluents de l'industrie textile sur l'environnement [14]

Les colorants dégagés dans le milieu aquatique sont caractérisés par leur très faible biodégradabilité, due à leur poids moléculaire élevé et à leurs structures complexes, confère à ces composés un caractère toxique pouvant être élevé ou faible [78]. De ce fait, ils peuvent persister longtemps dans ce milieu, engendrant ainsi des perturbations importantes dans les différents mécanismes naturels existant dans la flore (pouvoir d'auto-épuration des cours d'eau, inhibition de la croissance des végétaux aquatiques...) et dans la faune (destruction d'une catégorie de poissons, de microorganismes...) [2, 16, 24].

Face à ce problème de pollution, les entreprises du secteur textile algérien respectent la réglementation publiée dans le journal officiel 06-141 [83]. A cet effet, et afin de limiter la charge polluée des rejets liquides, ces derniers doivent répondre aux valeurs limites des rejets définis dans le tableau I.3.

**Tableau I.3.** Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides de l'industrie textiles [83]

Paramètres	unité	Valeurs limites	Tolérance aux valeurs limites Anciennes installations
Température	°C	30	35
pH	-	6.5-8.5	6-9
DBO <sub>5</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	150	200
DCO	mg.L <sup>-1</sup>	250	300
Matières décanales	mg.L <sup>-1</sup>	0.4	0.5
MES	mg.L <sup>-1</sup>	30	40
Oxydabilité	mg.L <sup>-1</sup>	100	120
Permanganate	mg.L <sup>-1</sup>	20	25

**N.B.** L'oxydabilité est l'aptitude d'un solvant à se combiner à l'oxygène.

## **I.6. Conclusion**

Ce chapitre a montré que les colorants azoïques et anthraquinoniques constituent la plus grande classe des colorants produits dans le monde. Les premiers trouvent des applications diverses, en particulier dans l'industrie textile. Tandis que les deuxièmes, sont caractérisés par une forte résistance à la lumière et aux attaques chimiques et microbiennes et présentent une large nuance de couleur, ce qui leurs confère une application importante dans la teinture et l'imprimerie.

En effet, l'industrie textile génère beaucoup de rejets liquides chargés en divers polluants organiques et minéraux, ce qui pose un vrai problème à l'homme et à l'environnement.

Face à ce problème, il convient de noter que les données publiées dans les normes algériennes sur les rejets de l'industrie textiles, ne précisent aucune teneur des colorants.

Le chapitre suivant donne donc une revue bibliographique sur les méthodes de traitement des colorants textiles en vue d'une élimination maximale de ces polluants en minimisant la formation des sous-produits dangereux.

## CHAPITRE II

---

### Procédés de traitement des colorants textiles

## **II.1. Introduction**

La pollution de l'environnement est l'un des problèmes major dans le monde, les industries constituent la première source de pollution y compris l'industrie textile. Cette dernière génère plus de  $28.10^4$  tonnes de colorants annuellement dans le milieu naturel [4, 26, 62].

D'après le rapport publié en 2002 par CAR/PP, l'Algérie est dotée de 39 entreprises dans le secteur de textile, et y consomme 40.12 tonnes de colorants et pigments/an, 16356 t/an de matières auxiliaires et une quantité d'eau dépassant 4.8 millions t/an. Ce qui génère des rejets volumineux et chargés. Cependant, selon les données publiées par la même référence, 30 % des industries correspondant aux sous-secteurs textiles de la teinture, du finissage et de l'impression possèdent des stations d'épuration des eaux résiduaires et 70 % réalisent le rejet sans épuration préalable [84].

Comme nous l'avons vue précédemment, une quantité plus au moins importante de colorant est dégagée dans les eaux de rejets sans aucun traitement préalable ou par manque d'affinité avec les surfaces à teindre, ce qui nécessite un traitement utilisant une ou des méthodes de dépollution adaptée. D'une part ce traitement permet de réduire les paramètres écologiques : DCO, DBO<sub>5</sub>, COT, les composés organo-halogénés adsorbables, la température, le pH et d'autre part la diminution de la concentration du colorant [85].

D'une manière générale, les colorants doivent être séparés et éliminés des rejets selon des méthodes incluant : les méthodes physiques, les méthodes chimiques et les méthodes biologiques [2, 26, 47, 79, 81, 85-87].

## **II.2. Procédés classiques de traitement des colorants textiles**

### ***II.2.1. Procédés physiques***

#### **A. Adsorption**

C'est la méthode la plus utilisée dans le traitement des eaux usées, elle est basée sur le contact entre l'effluent et la poudre ou les granules poreux, tels que le charbon actif, l'argile, déchets agricoles et les grignons d'olive [26, 86, 88-92].

La capacité de décoloration par adsorption sur charbon actif est maximal pour les colorants cationiques à mordant et les colorants acides, tandis qu'elle est très faible pour les colorants dispersés, directs, réactifs et les pigments [2].

---

Comme les colorants ne sont pas tous ioniques, la plupart des adsorbants ne peuvent pas réduire tous les colorants [93].

Toutefois, cette technique présente l'inconvénient du fait que la pollution déplace de l'état liquide à l'état solide. De plus, ces techniques, non destructives, nécessitent des opérations postérieures et onéreuses de régénération et de post traitement des déchets solides [47, 94].

### **B. Filtration membranaire**

Les différentes techniques de filtration peuvent être appliquées comme procédés principaux ou après traitement pour la séparation et la purification des effluents colorés [2, 26, 80, 86].

- ✓ L'osmose inverse et la nanofiltration peuvent enlever les colorants réactifs hydrosolubles.
- ✓ La microfiltration retient les matériaux colloïdaux tels que les colorants dispersés ou de cuve grâce à une membrane écran.
- ✓ L'ultrafiltration s'applique à la réduction de la DCO et des solides en suspension, et ne se montre réellement efficace qu'en prétraitement ou en combinaison avec d'autres traitements.

### **C. Coagulation/floculation**

Cette technique de traitement physico-chimique est utilisée pour enlever davantage la DCO et la couleur avant un traitement biologique. Ce procédé est basé sur l'addition d'un coagulant qui avec les polluants organiques forme des floes. Ces floes sont ensuite éliminés par décantation et filtration [2, 26, 95].

#### ***II.2.2. Procédés chimiques***

Ces procédés s'appliquent aux colorants en faible concentration et qui résistent aux traitements de biodégradation. L'oxydation et la réduction sont les méthodes chimiques les plus connues. Les réactifs les plus utilisés pour le traitement d'oxydation sont  $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $O_3$ ,  $Cl_2$ ,  $NaOCl$  et  $MnO_4$ , et pour la réduction, le  $Na_2S_2O_4$ . L'oxydation chimique conduit à la destruction ou la décomposition de la molécule du colorant.

---

Il a été observé que l'oxydation chimique avec l'un de ces oxydants n'est pas toujours efficace pour le traitement des polluants organiques persistants, et les colorants dispersés [2, 47, 85, 86, 96]. Dans ce cas, on fait appel aux procédés d'oxydation avancée.

### ***II.2.3. Procédés biologiques***

Les procédés d'épuration par voie biologique sont basés sur la biotransformation microbienne des colorants. Des recherches ont démontré la biodégradation partielle ou complète des colorants par des cultures des bactéries, des fungi et des algues. Par ailleurs, le traitement biologique pour la dégradation des effluents textiles peut être aérobie, anaérobie ou combiné selon le type de micro-organisme utilisé [24, 46, 97].

#### **A. Action des bactéries**

Les bactéries impliquées dans la dégradation des colorants peuvent être isolées du sol, de l'eau et même des animaux, les réactions de transformations sont de type oxydation ou réduction selon la présence ou l'absence de l'oxygène [3, 28, 55]. La réduction bactérienne des colorants azoïques est souvent initiée par le clivage de la liaison azo par l'enzyme azo-réductase sous condition anaérobie. Cette enzyme est présente dans plusieurs bactéries [30, 44, 54, 98]. Tandis que les colorants azoïques résistent aux transformations bactériennes sous conditions aérobies [99]. Toutefois, récemment, certains auteurs rapportent la capacité de certaines bactéries de décolorer ces colorants en présence d'oxygène [3, 54, 55].

Ainsi, il a été rapporté que les cellules de *Kocuria rosea* ont le potentiel de décolorer les colorants azoïques, triphénylméthane et d'autres colorants industriels tels que le vert malachite, l'orange méthylique, le bleu réactif 25 et le bleu direct 6 [100].

La biodégradation des colorants anthraquinoniques par plusieurs bactéries a été récemment étudiée par plusieurs auteurs [101, 102]. Ce groupe de colorant est moins susceptible d'être dégradé par réduction anaérobie par les enzymes intestinales, d'où un petit nombre de bactéries sont impliquées dans leurs biotransformation [26].

#### **B. Action des Fungi**

La classe la plus efficace des micro-organismes responsable à la décomposition des colorants synthétiques est la classe des mycètes (WRF : White Rot Fungi). Ces dernières produisent les enzymes ligninolytiques extracellulaires non spécifiques, capables de la

---

dépolymérisation et de la minéralisation aérobies étendues des composés xénobiotiques, aromatiques et/ou les colorants organiques [103-105]. Les enzymes extracellulaires principales participant à la dégradation sont la peroxydase de lignine, peroxydase de manganèse et la laccase [26, 104, 105]. En plus de la biodégradation enzymatique, les mycètes peuvent décolorer des solutions par biosorption [26, 79, 106]. Ainsi, la Dypéroxydase extraite de *Geotrichum candidum* Dec1 est capable de dégrader le Bleu Réactif 5 (colorant anthraquinonique) en acide phtalique et autres composés [107, 108].

### C. Action des algues

L'azoréductase des algues était l'enzyme principale responsable de la dégradation des colorants azoïques en amines aromatiques en cassant les liaisons azoïques [109]. Ainsi, la biodégradation de ces colorants est assurée par *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* et *Oscillatoria tenuis*. Le potentiel des espèces de *Cosmarium.sp*, appartenant aux algues vertes, a été étudié comme matière biologique viable pour le traitement biologique des colorants triphénylméthanes [109].

En outre, la majorité des colorants sont très stables et non biodégradables. Néanmoins, si ces techniques sont adaptées à un grand nombre de polluants organiques, elles ne sont pas toujours applicables sur les effluents industriels en raison des fortes concentrations de polluants, de leur toxicité qui entraînerait la mort des microorganismes ou de leur très faible biodégradabilité. Ces techniques génèrent des quantités importantes de boues biologiques à retraiter.

### II.3. Procédés alternatifs

Les procédés classiques utilisés par les stations de traitement des eaux usées sont mal et parfois pas du tout adaptés à l'élimination des colorants. La majorité de ces procédés sont trop sélectifs sur les catégories de colorants à traiter et ne font que déplacer la pollution plutôt que de la supprimer. Cependant, la technique de traitement adaptée doit être choisie afin de dégrader les molécules en évitant la formation de sous-produits plus dangereux que les composés initiaux.

---

### *II.3.1. Procédés enzymatiques*

Ces procédés sont classés entre les procédés chimiques et biologiques [5, 47]. Ainsi, la variété des transformations catalysées par les enzymes a fait ces derniers une cible principale pour l'exploitation des industries biotechnologiques. Cependant, des recherches récentes ont été entreprises pour une optimisation des procédés d'isolement et de purification des enzymes menues de capacité de transformation voire de détoxification des polluants persistants et récalcitrants des effluents industriels [87].

Ainsi, les avantages du traitement enzymatique par rapport aux traitements conventionnels peuvent être résumés comme suit [7, 110-112]:

- Inhibition par les substances toxiques est très faible ;
- Application aux polluants récalcitrants, couvrant un large intervalle de concentrations en polluants, de pH, de température et de salinité ;
- Facilité et simplicité du processus ;
- Absence de biomasse, et réduction de volume de réacteur ;
- Action catalytique efficace, sélective et très rapide ;
- Transformation de divers composés aromatiques.

Les enzymes isolées catalysent la détoxification/décoloration des colorants rapidement, (des minutes à quelques d'heures) par rapport aux algues et aux mycètes qui prennent plusieurs jours ou même mois pour fournir les mêmes résultats [113,114].

Les enzymes oxydoréductase : peroxydases, laccases et les oxydases de polyphénol ont montré leur potentiel dans la décoloration et la transformation des polluants aromatiques tels que les phénols, les amines aromatiques, les diphényles, les diphenols et les colorants (anthraquinoniques, azoïques, nitro et nitroso) en composés insolubles moins toxiques, qui pourraient être facilement enlevé de la solution [6, 8].

**A. Laccases**, (E.C 1.10.3.2), holoenzyme, est une glycoprotéine dimérique ou tétradimériques, contenant habituellement quatre atomes de cuivre par monomère. La laccase est une phénoloxydase qui catalyse l'oxydation de plusieurs substances aromatiques et inorganiques avec réduction de l'oxygène en eau [115, 116]. Cette enzyme est abondante dans les micro-organismes (particulièrement WRF) et les plantes [4, 117].

Parmi les applications dans les traitements des polluants, les laccases catalysent outre l'oxydation des phénols, les amines aromatiques, les composés non phénoliques, mais aussi la polymérisation des phénols et halogènes, anilines alkyliques. Ainsi, la laccase peut agir sur les chromophores tels que l'azo, les triarylmethanes, l'anthraquinoniques et

---

l'indigoïdes [4, 41, 87, 118]. Autres applications de la laccase se résument dans les domaines : alimentaire, textile, nano-biotechnologie, en synthèse chimique et en cosmétique [4, 116, 117].

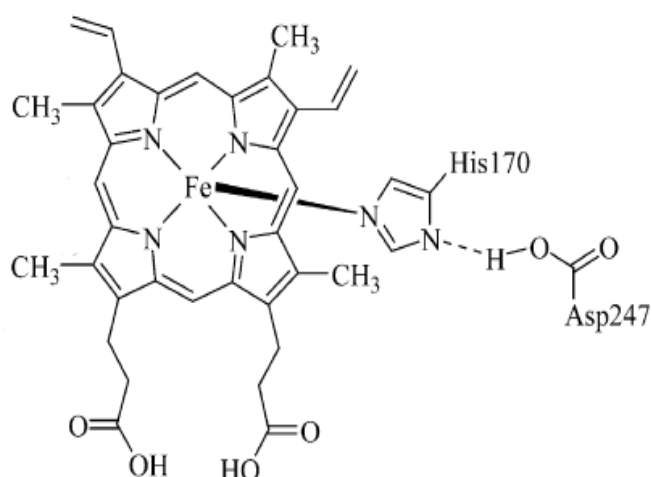
## **B. Peroxydases**

### **B.1. Structure moléculaire et cycle catalytique**

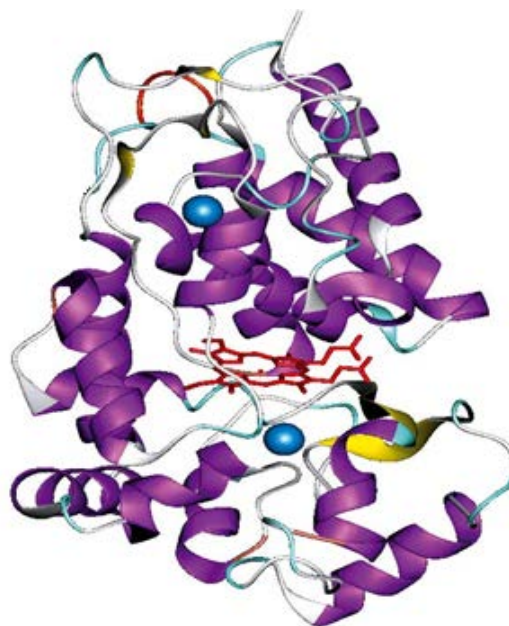
Les peroxydases (E.C.1.11.1.Z) sont des oxydoréductases, qui utilisent les peroxydes (comme le peroxyde d'hydrogène) comme un co-substrat pour oxyder une variété de composés organiques et/ou inorganiques. Leur présence était identifiée dans les plantes, les animaux et les microorganismes et leurs poids moléculaire varient de 30 à 150 kDa [5, 10, 119]. Selon la nomenclature établie par la commission européenne des enzymes, les peroxydases se classent en 16 familles [120]. Ainsi, leur nomenclature peut être selon la source : HRP : horse radish peroxidase (peroxydase de raifort), ou selon le substrat : cytochrome c peroxydase, lignine peroxydase [121].

La plupart des peroxydases sont de nature hemoprotéique (les autres contiennent dans le site actif le vanadium, le sélénium ou le manganèse.. d'où leur nom), où le groupe héminique est le coenzyme, il est caractérisée par la présence du  $Fe^{3+}$  comme ion central et 4 groupes pyrrole : Ferriprotoporphyrine IX (voir figure II.1) [122]. La deuxième partie est de nature glycoprotéine, elle est constituée de plusieurs chaînes polypeptidiques où le nombre d'acides aminés varie de 153 à 753 acides aminés distribués en 10 à 13 hélices  $\alpha$  et quelques chaînes  $\beta$ . Cette structure contient aussi deux sites de stabilisation de calcium ( $Ca^{2+}$ ) avec quatre ponts disulfures [122-125]. La peroxydase de raifort (HRP) est selon les bibliographies, la peroxydase la plus étudiées et qui trouve plusieurs applications [126-128].

La structure tridimensionnelle de la peroxydase d'HRP est représentée sur la figure II.2.



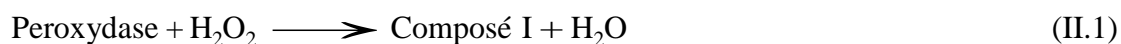
**Figure II.1.** Structure de Ferriporphyrine IX des peroxydases [124]



**Figure II.2.** Structure tridimensionnelle de la peroxydase de HRP [124]

Le site actif des peroxydases est constitué de la partie héminique, où l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est lié à cinq ligands : quatre avec les cycles porphyrine et un avec l'azote du noyau imidazole de l'histidine 170. La sixième liaison de coordination du  $\text{Fe}^{3+}$  sera engagée au cours de la catalyse par le peroxyde d'hydrogène [129, 130]. En effet, avec la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène (comme accepteurs d'électrons) rentre dans les réactions d'oxydation des substrats (phénols, indoles, amines aromatiques, et sulfonâtes), et en fin l'oxydation des substrats aromatiques conduit en leur polymérisation.

En général, les réactions catalysées par les peroxydases sont représentées comme suit [6, 130] :

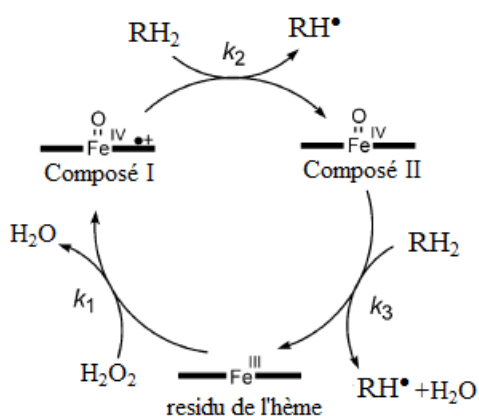


Où le  $\text{RH}_2$  est l'électron donneur et  $\text{RH}^\bullet$  est le radical produit de la réaction.

Le cycle catalytique des peroxydases commence par une oxydation de l'enzyme et une réduction de peroxyde d'hydrogène pour produire l'eau et le composé I : transfert de deux

électrons du fer  $^{3+}$  et du cycle porphyrine. Cette étape inclue le transfert d'un oxygène de peroxyde vers la partie ferrique d'enzyme, (le composé I contient un centre oxyferryle avec un fer sous l'état ferryl ( $\text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}$ )). D'une part le composé I oxyde le substrat ( $\text{RH}_2$ ) pour donner le radical correspondant ( $\text{RH}^\bullet$ ), et d'autre part, il se réduit pour produire le composé II. Comme dernière étape, le composé II est réduit à nouveau à l'état ferrique avec une deuxième molécule de substrat, en produisant la forme native de l'enzyme [120, 124, 19, 130].

En résumé, le cycle catalytique est montré sur la figure II.3.



**Figure II.3.** Cycle catalytique de la partie hémique de la peroxydase [124].

## B.2. Classification

Les peroxydases sont des enzymes intra ou extracellulaires, qui se secrètent par les microorganismes, les animaux et les plantes. Selon leur structure et leurs propriétés catalytiques, elles sont classées en trois familles [5] :

- ✓ **Peroxydases de classe I**, Se sont des peroxydases intracellulaires, on cite : cytochrome c peroxidase et ascorbate peroxydase, elles sont d'origine bactérienne [8].
- ✓ **Peroxydases fongiques extracellulaires (classe II)**, ce type de peroxydase est isolé de différents mycètes, particulièrement (WRF). La Manganèse peroxydase (MnP) et la Lignine peroxydase (LiP) sont des glycoprotéines, les plus impliquées dans la transformation des colorants synthétiques, leurs sources peuvent être différentes [8].
- ✓ **Peroxydases des plantes, (classe III)**, Se sont des glycoprotéines, leur chaîne polypeptidique contient environ 350 acides aminés, où leur séquence varie selon la source. Le poids moléculaire de cette classe de peroxydase, est compris entre (28 à 60 kDa) se

---

sont distribuées dans le raifort (HRP), le navet, la courgette ou BGP, les grains de Soja, la tomate, etc. Ainsi, cette classe de peroxydase est très impliquée dans le domaine de biotechnologie : en médecine, en biologie, et en chimie. Depuis plusieurs années, des études ont montrés leur capacité de décolorer et de transformer les phénols, les amines aromatiques et les colorants textiles efficacement [5, 12, 131-136].

Dans la cellule végétale, la peroxydase intervient dans plusieurs processus physiologiques [125, 137] :

1. Respiration et photosynthèse ;
2. Synthèse et dégradation des hormones ;
3. Décomposition de  $H_2O_2$  du cytosol ;
4. Oxydation des composés toxiques ;
5. Biosynthèse de la paroi cellulaire et de l'éthylène;
6. Réponse de défense; etc.

### **B.3. Applications de la peroxydase**

Récemment, les peroxydases reçoivent une attention particulière comme biocatalyseurs pour les applications de biosynthèse, de biotransformation et autres. La variété des réactions que catalyse la peroxydase a conduit en leur exploitation dans les applications biotechnologiques.

Leurs application industrielles a fait l'objet de plusieurs études, comme l'élimination des peroxydes des rejets industriels, décoloration et traitement des composés phénoliques, des amines aromatiques et d'autres réaction de biotransformations [121]. Ainsi il a été montré leur application en biochimie clinique et comme testeurs immunologiques [10].

#### **✓ Dégradation des colorants synthétiques**

La plupart des colorants synthétiques ne se prêtent pas à des eaux usées par un traitement biologique conventionnel en raison de leurs structures, et le traitement des effluents contenant des colorants implique généralement des méthodes physico-chimiques.

Certains auteurs ont montré que la destruction oxydative des composés colorés est considérablement stimulé par des enzymes oxydatives, et peut-être d'un intérêt pratique pour la décoloration des colorants synthétiques.

---

Les enzymes des microorganismes tels que la lignine peroxydase (LiP) et la manganèse peroxydase (MnP), tous deux associés à la lignine sont impliqués dans la décoloration de colorants azoïques, anthraquinoniques et phtalocyanures [138, 139].

Moreira et al. (2001) [140], ont montré la capacité de la Mn peroxydase de dégrader la structure des colorants récalcitrants polymériques.

La LiP est utilisée pour la transformation et la minéralisation des colorants azoïques, triphénylméthane, phtalocyanures et polymériques [141]. Les autres peroxydases microbiennes telles que Dec peroxydase et versatile peroxydase sont capables de transformer quelques colorants azoïques et anthraquinoniques [106, 142].

Les peroxydases d'origine végétales sont connues par leurs capacités de transformer un large nombre de composés colorés via leur précipitation. Des études récentes sur plusieurs types de peroxydases des plantes, en particulier celles de radis et de courgette, montrent une très grande efficacité pour les colorants textiles récalcitrants avec des rendements de décoloration important. Ainsi, le traitement de quelques colorants textiles et non textiles par la peroxydase de courgette, a conduisait à leurs dégradation et leurs élimination [5, 136].

Le tableau II.1. récapitule les principales peroxydases végétales impliquées dans le traitement des colorants et effluents textiles.

### ✓ Transformation des composés phénoliques

Les peroxydases sont connues aussi par leur capacité de polymériser certains composés organiques récalcitrants tels que les phénols, les phénols substitués et les amines aromatiques présents dans les eaux usées des raffineries de pétrole et de nombreuses autres industries, y compris les plastiques, textiles et les industries forestières. Leur présence dans les rejets présente un risque major pour la santé publique [10, 131].

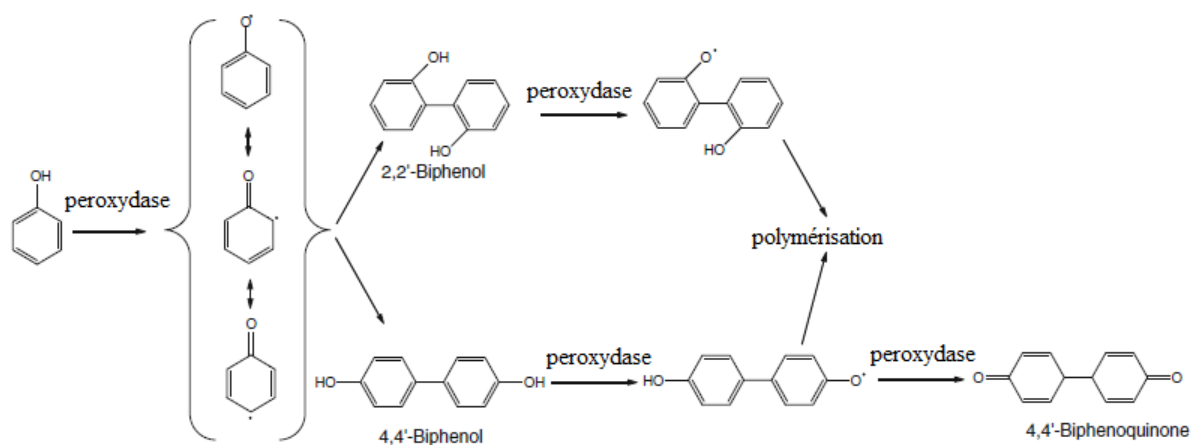
Le mécanisme de transformation peroxydasique des composés phénoliques se fait en premier lieu par la formation des radicaux phenoxy qui après leurs diffusion du site actif de la peroxydase réagissent pour former des dimères, des oligomères ou des polymères insolubles qui peuvent séparés par simple décantation [81, 121, 160], selon la réaction de la figure II.4.

La majorité des études sur la transformation des phénols et des amines aromatiques, se rapporte sur les peroxydases de raifort, de navet et de courgette (BGP) sous forme libre ou immobilisée [15, 131, 161-163]. Ainsi, un tel traitement se fait dans des conditions

expérimentales douces. Par conséquent, des études de l'effet du pH, la concentration en substrat, le temps de réaction et l'effet de quelques additifs ont été étudiés, pour optimiser des états de réaction [164].

**Tableau II.1.** Principales applications des peroxydases végétales dans le traitement des colorants et effluents textiles

Source de peroxydase	Colorant / Effluent	Référence
<b>HRP</b>	Noir acide 10BX	[145]
	Bleu Remazol , Rouge Cibacron	[134]
	Jaune direct 12	[146]
	Orange II	[147]
	Turquoise remazol	[128]
	Orange acide 7	[148]
	Naphtol bleu noir	[149]
<b>Peroxydase de navet</b>	Cinq colorants acides	[132]
	Colorants directs azoïques	[150]
	Mélange de colorants	[151]
<b>BGP</b>	21 colorants textiles et non textiles	[152]
	Huit colorants réactifs	[153]
	Rouge dispersé 17 et Marron dispersé 1	[133]
	Effluent textile	[154]
		[155]
	Colorants dispersés	[156]
<b>Peroxydase de tomate</b>	Colorants directs	[143]
<b>Peroxydase de chou-fleur</b>	Effluent textile	[157]
<b>Peroxydase de grain de soja</b>	Colorant acide	[158]
	Jaune direct 11	[12]
	Bleu Brillant Remazol R	[159]



**Figure II.4.** Mécanisme d'oxydation et de polymérisation du phénol par la peroxydase [82]

### ✓ Synthèse des polymères

Les radicaux libres produits par catalyse de la peroxydase peuvent participer aux différentes réactions post-enzymatiques. Les réactions de polymérisation par oxydation de composés aromatiques par oxydoréductases ont été étudiées pour créer de nouveaux polymères fonctionnels et de synthétiser les résines phénoliques avec une bonne sélectivité de conversion. Cela peut être réalisé sans formaldéhyde, qui doit être utilisé dans la polymérisation chimique [165].

En effet, la peroxydase de soja catalyse la polymérisation oxydative de cardanol, en utilisant du méthanol, de l'éthanol, du propanol-2, t-butylel'alcool ou de 1-4- dioxane.. D'autres réactions de polymérisation peroxydasique sont fortement favorisées par apport à la polymérisation chimique, comme la synthèse des polyanilines [165].

### ✓ Biocapteurs à base de peroxydase

Un domaine qui offre de grands potentiels pour les applications de la peroxydase comprenant les biocapteurs électrochimiques. Récemment, les électrodes à base de la peroxydase ont été largement utilisées dans les systèmes d'analyse pour la détermination de peroxyde d'hydrogène, les hydro-peroxydes organiques, les phénols et les amines aromatiques [165, 166].

Le principe est basé sur la notion du cycle catalytique de la peroxydase, par oxydation de deux molécules de substrats. Toutefois, dans un tel système l'électrode remplace l'électron provenant de substrat, l'enzyme immobilisé sur l'électrode est oxydé par le peroxyde d'hydrogène pour former le composé I et est réduit par l'électron provenant de l'électrode, selon la réaction (II.4) [10, 165]:



Quand, le substrat est présent dans le système peroxydase-électrode, le substrat sera réduit par l'électrode :



Durant le transfert d'électrons, ces derniers agissent comme deuxième substrat pour la réaction enzymatique, résultant ainsi un changement du potentiel de l'électrode, qui se traduit par une mesure de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### B.4. Immobilisation de la peroxydase

Les enzymes sont des biocatalyseurs, très impliquées dans les applications biologiques, analytiques, biotechnologiques et environnementales, pour leurs hautes sélectivités, spécificité et activité, mais sous certaines conditions. Une utilisation effective de l'enzyme soluble est limitée par la non réutilisation, l'instabilité voire la dénaturation due à la présence des substrats, des produits ou autres composés de la réaction et la sensibilité aux conditions de l'expérience [167].

Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un support solide avec une activité catalytique retenue. L'immobilisation dans des supports organiques, inorganiques et dans des supports hybrides, peut conduire en une modification de la structure protéique de l'enzyme voire le site actif, ce qui peut alors induire une modification de leur activité. Pour la peroxydase, cette modification résulte aux niveaux : de groupement imidazole de l'histidine et autres acide aminés d'une part et les groupements hydroxyles de glycoprotéine ou le groupement hémique d'autre part [166].

Cependant, par rapport à l'enzyme libre, certains paramètres tels que le pH, la température et les paramètres cinétiques changent pour l'enzyme immobilisée [167]. Le modèle de Michaelis-Menten reste valide à condition de lui appliquer quelques corrections afin de l'adapter aux milieux hétérogènes. Les constantes diffusionnelles du substrat et des produits doivent être prises en compte ce qui permettra de définir une nouvelle constante  $K_M$ , appelée  $K_{Mapp}$  pour constante apparente [168].

Comme pour les enzymes, l'immobilisation de la peroxydase présente un nombre d'avantages [168] :

- ✓ Moyen de protection contre les agents chimiques d'inactivation ; et les contaminants microbiologiques ;
- ✓ Augmentation de la stabilité thermique ;
- ✓ Possibilité de récupérer l'enzyme ce qui rends le procédé moins couteux ;
- ✓ Récupération facile, rapide et quantitative de l'enzyme ;
- ✓ Mise en conception des bioréacteurs enzymatiques.

Les peroxydases de sources fongiques et des plantes peuvent être immobilisées par les différentes méthodes, en utilisant différents types de supports. De même, elles se sont

testées d'une part pour leurs capacités de dégrader voire éliminer un large nombre de polluants organiques [154, 156,163], et d'autres part, pour leurs importance dans les applications de nanotechnologie et biotechnologie comme : la chromatographie de bio-affinité, et les biocapteurs [169].

L'efficacité de l'opération d'immobilisation dépend du choix de la méthode d'immobilisation et de support, qui constitue également un paramètre important. En effet, la diffusion des différents substrats va être fortement modifiée par rapport aux systèmes homogènes mais également en fonction de la méthode d'immobilisation. Le support doit présenter des propriétés physiques et chimiques appropriées à la méthode d'immobilisation utilisée telle que la taille et la densité des particules, l'hydrophobicité ainsi que la résistance mécanique. Des conditions optimales pour avoir une immobilisation satisfaisante doivent être recherchées [170].

Plusieurs méthodes d'immobilisation ont été décrites dans la littérature :

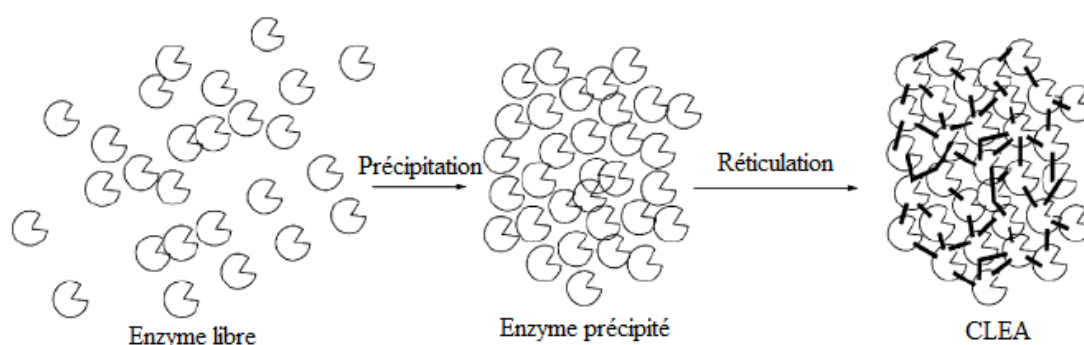
- L'adsorption sur support inerte;
- La liaison covalente entre un porteur et des groupes fonctionnels de l'enzyme.
- La réticulation avec des réactifs bi ou multivalents ;
- L'inclusion dans une matrice ;

En effet, pour immobiliser l'enzyme, on doit considérer son efficacité, le maintien de l'activité de l'enzyme et le taux d'enzyme dans le support. Les principales méthodes d'immobilisation de peroxydase décrites et appliquées dans le traitement des colorants et effluents textiles sont résumées dans le tableau II.2.

Les techniques d'immobilisation déjà citées semblent entraîner de manière générale des modifications chimiques qui altèrent les propriétés catalytiques de l'enzyme immobilisée. Cela implique donc d'augmenter la quantité de biomolécules confinées pour récupérer une activité biologique suffisante

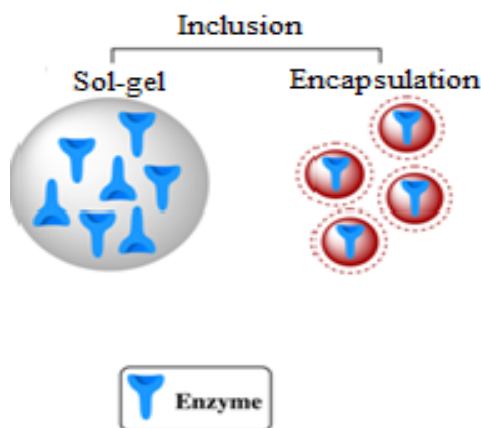
**Tableau II.2.** Méthodes d'immobilisation des enzymes et applications au traitement des colorants et effluents textiles par les peroxydases

Méthode d'immobilisation	Principe	Avantage	Inconvénient	Support et applications
<b>Adsorption [170]</b>	Interactions physiques : Liaisons hydrogène, Van Der Waals, homophiles...	- AE maximale - Simple - Economique	- Non spécifique - Désorption d'enzyme - Contamination	- Silicates modifiées : colorant anthraquinonique [172]
<b>Couplage covalent [171]</b>	Formation liaisons covalentes entre les groupements : NH <sub>2</sub> , OH...d'enzyme et les groupements fonctionnels de support en présence ou en absence d'un agent de greffage.	- Efficacité d'immobilisation élevée. - Meilleure activité spécifique. - Haute stabilité.	- Dénaturation d'enzyme. - Couteuse. - Immobilisation non uniforme.	- Amidon/alginate/ Concanavaleine A : effluent textile [154] - Sephadex/ Concanavaleine A : colorants azoïques et anthraquinoniques [153] - Polysulfones modifiés : colorants azoïque et anthraquinonique [173]
<b>Réticulation [170]</b>	Formation des liaisons covalentes entre les molécules d'enzymes (voir figure.II.5)	- Forte concentration d'enzyme. - Non couteuse - Protection maximale d'enzyme	- Dénaturation par les agents liants. - Non valable pour toutes les enzymes.	Polyaniline/polyacrylonitrile colorants azoïques [174]

**Figure II.5.** Principe de la réticulation enzymatique d'après Hanefeld et al. [175]

**L'inclusion** comme méthode d'immobilisation physique et irréversible tend à minimiser ce problème. Elle consiste à inclure l'enzyme dans un réseau polymérique de formes diverses (figure II.6):

- ✓ Gel de polymère (organiques, inorganiques ou hybrides) où la technique est appelée inclusion dans gel.
- ✓ Compartiments membranaires (microcapsule ou fibre) où elle est appelée microencapsulation.



**Figure II.6.** Méthode d'immobilisation par inclusion dans une matrice gel et dans une microcapsule [177]

Le support isole donc les enzymes partiellement du milieu extérieur et les protège en laissant diffuser les substrats et les produits. La réalisation de cette méthode est basée sur la synthèse du réseau polymérique en présence de l'enzyme [170].

**La microencapsulation**, est réalisée dans des membranes de formes diverses dont les tailles du nanomètre au micromètre peuvent être ajustées selon la dimension des biomolécules à immobiliser. Le matériau semi perméable et flexible, son efficacité dépend de la taille de pore de la membrane ce qui limite l'accès au microenvironnement de l'enzyme en le protégeant des conditions extrêmes de l'expérience. En effet, cette technique présente l'inconvénient d'être difficile à réaliser par le contrôle précis de diamètre des pores en particulier les enzymes de bas poids moléculaire.

De plus, elle est n'est pas appliquée pour les substrats de grand poids moléculaire [170].

En ce qui concerne **l'inclusion dans les gels**, la méthode permet la construction du gel autour de les biomolécules, en respectant les facteurs de forme des macromolécules biologiques et en minimisant les contraintes stériques. Les précurseurs moléculaires du gel peuvent s'adsorber et polymériser à la surface des biomolécules pour former un réseau. La synthèse doit être réalisée dans des conditions chimiques adéquates pour la conservation

des propriétés enzymatiques [170]. Pour l'inclusion des peroxydases, les matériaux les plus utilisés dans cette technique sont les polymères inorganiques modifiés ou non à base de silice et organiques tels que: le polyacrylamide, l'alginate, l'amidon et le chitosan et même en hybridation des deux [175, 176].

La mise en réalisation d'une immobilisation nécessite un choix adéquat de la méthode et du support ; l'alginate est un hétéro biopolymère de sels  $\alpha$ -L-guluronique et  $\beta$ -D-mannuronique. Il est largement utilisé dans les techniques d'inclusion, de microencapsulation et dans la réticulation grâce à simple gélification en présence de cations bivalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sa haute biocompatibilité vis-à-vis l'enzyme et sa non toxicité.

Ainsi, le taux des deux monomères dans l'alginate tend à obtenir des tailles de pore différent dans les billes formées [168].

Les peroxydases retenues sur ou dans les matrices d'alginate sont impliquées dans plusieurs domaines, mais récemment, elles ont attiré l'attention des chercheurs pour le traitement des composés aromatiques, des colorants et des phénols présents dans les effluents. Le tableau II.3, présente les différentes préparations d'immobilisation de peroxydase et leurs applications dans le traitement des colorants synthétiques et les effluents textiles.

**Tableau II.3.** Utilisation de quelques peroxydases immobilisées par inclusion dans le traitement des polluants organiques

Nom de peroxydase	Type de source	Nom du support	Colorant/effluent	référence
<b>HRP</b>	Raifort	billes d'alginate	Orange acide 7 Bleu acide 25	[178]
		Polyacrylamide	Noir acide 10 BX	[145]
		Alginate, polyacrylamide	Jaune direct 12	[146]
		Billes d'alginate	phénol	[179]
<b>BGP</b>	Courgette	hybride : Concanavaline A/billes d'alginate :	Effluent textile	[154, 155]
<b>Peroxydase de navet</b>	Navet	Billes d'alginate	Phénol	[180]
<b>MnP</b>	Phanerochaete Chrysosporium	Billes d'alginate	Violet direct 51, Noir réactif 5, Xylidine ponceau, Marron bismark R	[181]

### II.3.2. Procédés d'oxydations avancées

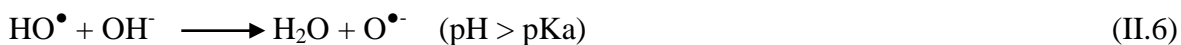
Les procédés d'oxydation avancée (POA) sont des procédés alternatifs de traitement des effluents en milieux aqueux qui ont connu une évolution rapide au cours des vingt dernières années.

Les effluents des industries textiles sont des liquides fortement chargés en matière polluante, y compris les colorants. La structure des groupements chromophores ainsi que la matrice des colorants, rend ces derniers non dégradables ou partiellement dégradables par les méthodes classiques chimiques voire biologiques en générant des composés intermédiaires plus toxiques. Cependant, les POA conduisent d'une part, en une transformation des polluants organiques en produits facilement biodégradables et d'autre part, en une décomposition partielle voire élimination des groupements chromophores et des structures aromatiques des colorants [182].

Le principe des réactions d'oxydation avancée est basé sur la génération en milieu aqueux des radicaux libres, en particulier  $\text{HO}_2^\bullet$  et  $\text{HO}^\bullet$ , généralement à la température ambiante. Les radicaux hydroxyle  $\text{HO}^\bullet$  (comme oxydant primaire) est l'espèce oxydante la plus réactive, après le fluor ( $E_0 = 2.8\text{V/ENH}$ ) [182]. Ces radicaux ne sont pas sélectifs et réagissent rapidement avec les composés organiques en conduisant en une minéralisation complète ou partielle des polluants organiques en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et autres produits inorganiques ; ou en produits intermédiaires biodégradables, respectivement [13].

#### A. Réactivité des radicaux hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ )

Le radical hydroxyle de nature électrophile est un acide faible : dans le couple ( $\text{HO}^\bullet/\text{O}^{\bullet-}$ ) son  $\text{pK}_a$  est égal à 11.9, (réaction II.6), [183].



Selon la structure du composé organique, en présence du radical ( $\text{HO}^\bullet$ ), ce dernier peut réagir avec les composés insaturés : éthyléniques et aromatiques, plus rapidement (les constantes de vitesse étant de l'ordre de  $10^8$  à  $10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) qu'avec les composés aliphatiques [182, 184].

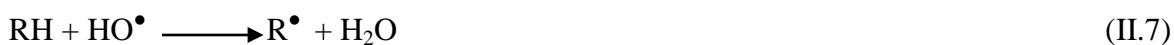
Les radicaux hydroxyles peuvent aussi attaquer les cycles aromatiques dans les positions occupés par des halogènes, conduisant à la génération des phénols correspondant. Il a été démontré que la réactivité des radicaux hydroxyles est proportionnelle au nombre de

position de site occupé du cycle aromatique. Il présente une réactivité importante avec les aromatiques porteurs des groupements activant (-OH, -NH<sub>2</sub>) qu'avec ceux présentant des groupements désactivant (-NO<sub>2</sub>, -COOH), de plus il réagit rapidement avec les aromatiques monosubstitués que les polysubstitués [185].

D'autre part, les HO<sup>•</sup> peuvent agir sur les composés organiques suivant un processus assez complexe impliquant la transformation chimique des polluants selon trois mécanismes différents [184]:

**1. Réaction d'arrachement d'un atome d'hydrogène :**

Elle se fait par arrachement d'atomes d'hydrogène sur les chaînes hydrocarbonées saturées :



**2. Réaction d'addition électrophile sur une liaison insaturée :**



Où : Ar est un aryle ; X est un hétéroatome

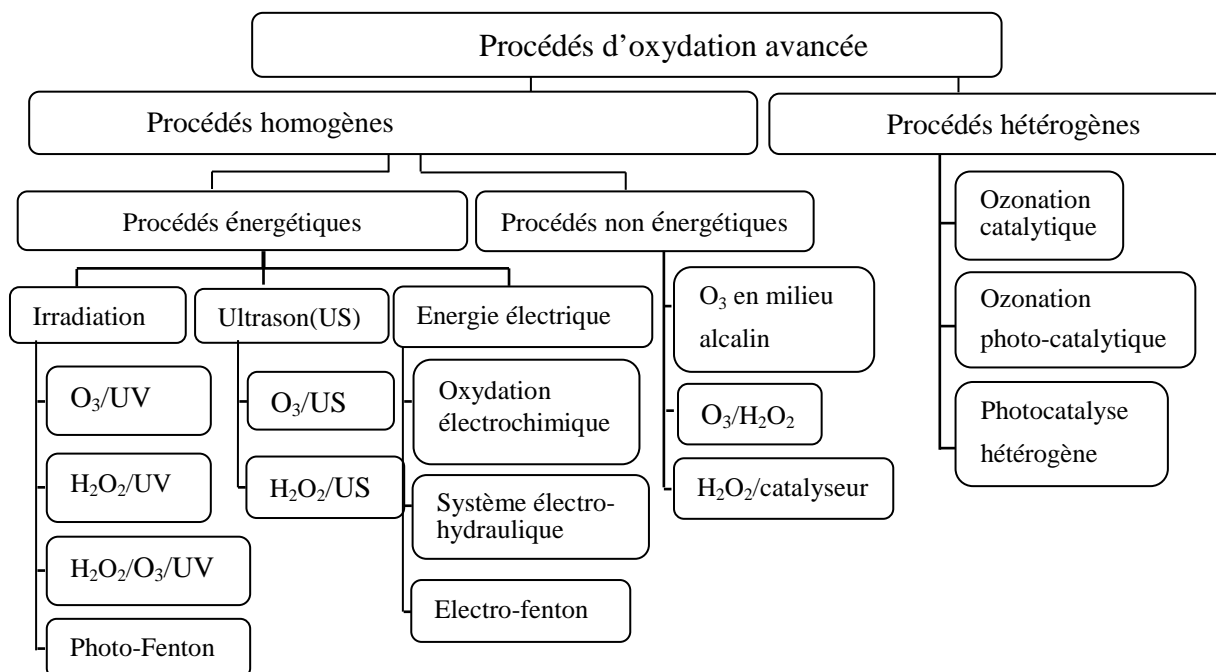
**3. Réaction de transfert d'électron :**



### B. Principaux procédés d'oxydation avancée

La forte réactivité et l'instabilité du radical hydroxyle dans le milieu réactionnel implique des concentrations instantanées et une durée de vie très faible, elles sont de l'ordre de 10<sup>-10</sup> à 10<sup>-12</sup> mol.L<sup>-1</sup> [185], et à titre d'exemple le temps de demi vie dans l'eau est estimé inférieur à 7.10<sup>-8</sup> s [187].

De ce fait, ces radicaux doivent être produits de manière continue au moyen de plusieurs réactions : chimiques, électrochimiques, photochimiques ou sonochimiques. Deux types de classification des principaux procédés générant les radicaux hydroxyles, soit selon la phase de réaction homogène ou hétérogène ou selon la méthode employée pour générer ces radicaux. L'organigramme de la figure II.7 récapitule les différentes technologies des POA générant les radicaux hydroxyle appliqués dans le traitement des effluents industriels liquides [14, 186, 187].



**Figure II.7.** Différents POA générant HO<sup>•</sup> utilisés dans le traitement des effluents Liquides [188]

Dans ce qui suit, nous citons les principes de quelques POA, et comme notre travail est consacré à l'utilisation du procédé Fenton, il serait utile de traiter les différents procédés basés sur ce dernier.

### B.1. Procédés photochimiques

Nécessitant une source de rayonnement : artificielle (lampes UV) ou irradiation par rayonnement solaire. Ces procédés sont très utilisés dans le traitement des eaux, soit seuls, soit combinés avec des systèmes oxydants, principalement l'ozone, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène, en système homogène ou hétérogène.

✓ **Photolyse de l'O<sub>3</sub>** [187] : Le processus d'ozonation combiné est basé sur l'irradiation de l'ozone par l'UV à  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .



✓ **Photolyse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** [187]: en irradiant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à des longueurs d'ondes de 200 à 280 nm, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se décompose en conduisant à la formation des radicaux hydroxyles, avec un rendement quantique de deux •OH formés pour un photon absorbé



✓ **Photo-peroxonation O<sub>3</sub>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV** [185] : le couplage à la fois du rayonnement UV et du peroxyde d'hydrogène rend la photolyse de l'ozone meilleure que le premier procédé, par accélération de la décomposition de l'ozone, d'où une élévation dans la production des radicaux hydroxyle:



✓ **Photocatalyse hétérogène** [188] : l'utilisation des catalyseurs solides (semi-conducteurs comme TiO<sub>2</sub>) en combinaison avec l'irradiation UV ( $\lambda < 380$  nm) a été très utilisé pour le traitement voire la minéralisation des colorants textiles.

La photogénération des radicaux hydroxyle par le procédé TiO<sub>2</sub>/UV se fait par oxydation des OH<sup>-</sup> et de l'eau sous l'irradiation du dioxyde de titane en formant aussi un photon et un électron, ce dernier est impliqué dans la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les radicaux : O<sub>2</sub><sup>-•</sup> et HO<sub>2</sub><sup>•</sup>.

## B.2. Irradiation avec les Ultrasons

Connue aussi sous nom sonolyse ou sonochimie, ce procédé est basé sur l'irradiation des polluants organiques comme les colorants textiles par application des ultrasons seuls ou combinés (avec O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou Fenton). La pyrolyse de l'eau se fait dans des conditions particulières de température et de pression selon la réaction [13] :



Les radicaux HO<sup>•</sup> agissent directement sur les substrats organiques en solution aqueuse directement ou après avoir procédé à une série de réactions.

Certains auteurs ont montré l'efficacité de combinaison de sonolyse avec l'ozone dans la dégradation des colorants, par rapport à l'ozonation seule [188].

Ce procédé présente plusieurs inconvénients tels que : le prix élevé ainsi qu'il ne conduit pas en minéralisation complète, d'où il est utilisé en combinaison avec l'ozonation ou le procédé Fenton [47, 188].

---

---

### B.3. Procédés électrochimiques

Les procédés électrochimiques d'oxydation avancée permettent d'éliminer ou de réduire des composés organiques bioréfractaires et toxiques en produisant les radicaux hydroxyles directement dans le milieu par électrochimie. Généralement, ces radicaux sont générés de deux manières par oxydation anodique (directe) ou par électro-Fenton (indirecte).

La première est basée sur la transformation des polluants soit directement par les réactions de transfert des électrons ou par les HO<sup>•</sup> produits sur la surface de l'électrode comme l'indique la réaction (II.15) [13].



### C. Procédés Fenton

L'oxydation par la réaction Fenton est l'un des POA étudiés par plusieurs chercheurs dans le traitement des effluents industriels contenant une grande variété de substrats organiques notamment les alcools, les éthers, les colorants, les phénols, les pesticides et les composés aromatiques polycycliques [13, 181].

Malgré sa découverte depuis 1894 par H.J.H. Fenton, lors de l'oxydation de l'acide tartrique en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des ions ferreux appelés réactifs Fenton, ce n'est qu'en ces dernières décennies que l'importance des réactions de HO<sup>•</sup> a été achevée [14]. Le procédé Fenton possède trois caractéristiques attractives suivantes pour le traitement des polluants [189] :

- ✓ les réactifs Fenton sont sans danger;
- ✓ simple à manipuler et non coûteux ;
- ✓ Absence de limitation de transfert de masse (en catalyse homogène) ;
- ✓ Augmenter la biodégradabilité voir dégrader les composés toxiques ou inhibiteurs avant un traitement biologique ;
- ✓ Minéraliser les polluants organiques dans les effluents à forte teneur en DCO.

#### C.1. Principe

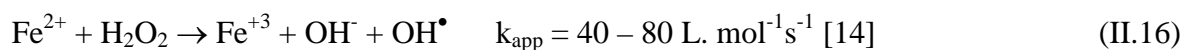
Le système Fenton classique est un procédé catalytique en phase homogène basé sur la génération des radicaux hydroxyles (HO<sup>•</sup>) à pH acide à partir d'un transfert d'électron entre le peroxyde d'hydrogène et les ions du fer qui agissent comme catalyseur [13]. Les

ions ferriques conduisent aussi à la génération des radicaux hydroxyle mais selon une série de réactions plus longue.

Ainsi, il a été démontré qu'en milieu acide, outre les radicaux hydroxyle formés lors de la décomposition des molécules d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de  $\text{Fe}^{2+}$ , les radicaux moins réactifs et moins oxydants tels que  $\text{HO}_2^{\bullet}$  et  $\text{O}_2^{\bullet-}$  sont aussi produits [190].

### C.2. Mécanisme réactionnel

Plusieurs chercheurs se sont intéressés aux réactions Fenton initiées par la réaction de Fenton (réaction II.16) au niveau réactionnel et au niveau des applications dans le domaine d'oxydation des substrats organiques et inorganiques en milieu aqueux [13, 14].

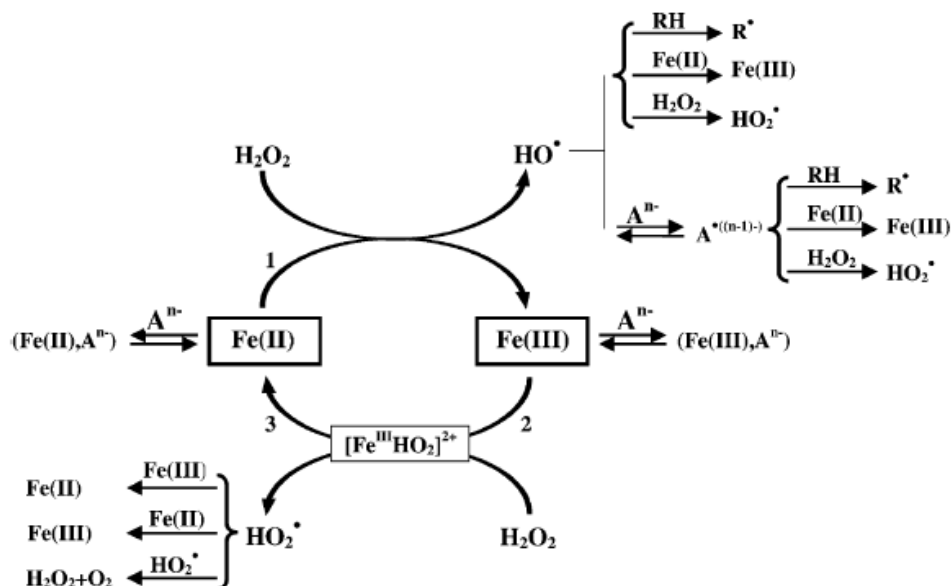


En absence ou présence des substrats organiques ou minéraux, de nombreuses réactions peuvent avoir lieu en fonction des conditions opératoires (pH, concentration en réactifs Fenton). En effet, le système Fenton est assez complexe du point de vue réactions régénérées. Le schéma de la figure II.8 montre les principales réactions de la décomposition de peroxyde d'hydrogène par les ions du fer en milieu acide qui passe par la formation des radicaux hydroxyle et hydroperoxyde en mettant en jeu la formation des complexes du fer [14]. Le tableau 1.1 de l'annexe 1 dresse un inventaire non exhaustif des réactions impliquées (et les espèces présentes dans le milieu réactionnel) dans le mécanisme de dégradation du peroxyde d'hydrogène par le  $\text{Fe}^{2+}$  et/ou  $\text{Fe}^{3+}$ .

Ces réactions peuvent être découpées en étapes suivantes :

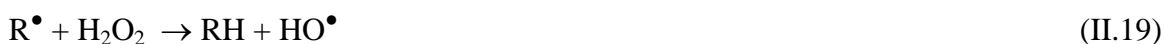
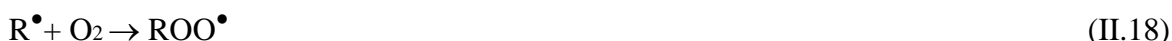
- ✓ *Etape d'initiation* : correspond à la formation des radicaux hydroxyle (réaction II.16). Elle comprend la formation et la décomposition des complexes hydroperoxydes de  $\text{Fe}^{3+}$  en ions ferreux et en radicaux hydroperoxyde (réactions A.9-A.12).
- ✓ *Etape de propagation* : les radicaux hydroxyle produits réagissent avec les ions ferreux et le peroxyde d'hydrogène, ce dernier joue le rôle de générateur et de piègeur des radicaux hydroxyle. Cependant, le couple  $\text{HO}_2^{\bullet}/\text{O}_2^{\bullet-}$  existe simultanément dans le milieu.

Ainsi, les radicaux hydroxyle oxydent les composés organiques s'ils sont présents dans le milieu réactionnel selon les réactions générant le radical  $R^\bullet$  (figure II.8) [191].



**Figure II 8.** Schéma simplifié des réactions Fenton en milieu acide, ( $A^{n-}$  : anion inorganique,  $RH$  : composé organique) [191]

Les radicaux organiques intermédiaires  $R^\bullet$  peuvent, par la suite, être soit oxydés par  $Fe^{3+}$ ,  $O_2$ ,  $H_2O_2$  ou  $HO^\bullet$  (réactions II.17 à II.20) ou polymérisés (réaction.II.21) :



Il faut noter que d'autres études montrent que les ions intermédiaires comme les ions ferryles ( $[FeO]^{2+}$ ) peuvent aussi oxyder la matière organique en plus que des  $HO^\bullet$  [192]. D'autre part le système Fenton peut être influencé par la présence des anions inorganiques ( $A^{n-}$ ) qui constituent des ligands avec les ions du fer [191].

✓ *Etape de terminaison* : implique les réactions entre tous les radicaux présents dans le milieu réactionnel.

---

### C. 3. Cinétique de dégradation

Le mécanisme de cinétique des réactions Fenton a été étudié par plusieurs chercheurs [14, 192]. L'examen des réactions, citées en annexe, montre que la réaction de génération des radicaux hydroxyle est l'étape limitante parce que cette réaction est, relativement lente par rapport à leurs réactions avec les substrats organiques et les sous-produits d'oxydation formés. Ainsi, la régénération des ions ferreux est lente, par rapport à leurs consommations [193].

Gallard et De Laat (2001) [193], suggèrent que le procédé d'oxydation de Fenton est une réaction du premier ordre. Guedes et al. (2003) [194] prouvent qu'elle obéit à une cinétique d'ordre 2.

Les deux ordres de la cinétique Fenton peuvent être dérivés d'une équation générale (II.22) d'ordre  $n$  reportée dans les travaux de Wang (2008) [195] :

$$\frac{dC}{dt} = -kC^n \quad (\text{II.22})$$

Les équations d'ordre 1 et 2 sont données par les équations II.25 et II.24, respectivement :

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (\text{II.23})$$

$$C = \frac{C_0}{1+kC_0t} \quad (\text{II.24})$$

Guedes et al. (2003) [194] ont proposé un premier ordre de la réaction pour substrat organique, du fait que les radicaux hydroxyles apparaissent lentement et disparaissent rapidement du milieu réactionnel, donc leur concentration est maintenue quasi-stationnaire, il en résulte qu'une constante de vitesse apparente est utilisée.

### C. 4. Paramètres influençant le procédé Fenton

Le pH, la température, la concentration des réactifs Fenton ainsi que la concentration des polluants affectent fortement l'efficacité du procédé Fenton : en terme de rendement de transformation et de cinétique.

✓ *pH* : le procédé Fenton est composé de quatre étapes principales : ajustement du pH dans la zone acide, réactions d'oxydation ; neutralisation et coagulation/précipitation [13].

Le comportement des ions ferriques dépend du pH (voir tableau II.4).

**Tableau II.4.** Ions ferriques hydratés en fonction du pH [13]

Ions ferriques	pH
$\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$	1-2
$\text{Fe}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$	2-3
$\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4^+$	3-4
$\text{Fe}(\text{OH})_3$	4-10

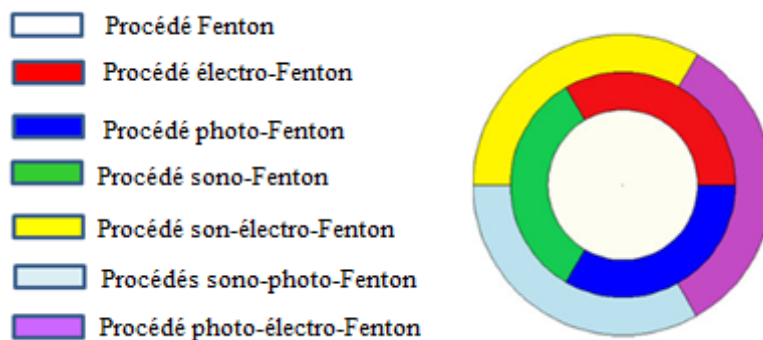
- Aux  $\text{pH} < 2$  : il y a formation des complexes  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  qui sont moins réactif avec le peroxyde d'hydrogène, ce dernier est sous sa forme protonée ( $\text{H}_3\text{O}_2^+$ ) [13].
- Aux  $2 < \text{pH} < 3$  : la vitesse de décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par le Fe(II) augmente car dans cette gamme de pH la forme hydroxyde de fer est prédominante et beaucoup plus réactive que l'ion  $\text{Fe}^{2+}$ . Par ailleurs, le pH contrôle la vitesse de formation des radicaux hydroxyle [196].
- Aux  $\text{pH} > 3$  : diminution de l'efficacité du procédé Fenton à cause de [14]:
  1. Le peroxyde d'hydrogène subit une auto-décomposition ;
  2. Le potentiel d'oxydation des radicaux hydroxyles diminue, il est égale pour le couple  $\text{HO}^\bullet/\text{H}_2\text{O}$  à  $E_0 = 2.59 \text{ V/ENH}$  à  $\text{pH} = 0$  et  $1,74 \text{ V/ENH}$  à  $\text{pH} = 14$ . D'où se produit une réduction des radicaux hydroxyles et formation des hydroxydes ferriques.
  - ✓ *Température* : les conditions de température ambiante mènent à une bonne efficacité. En revanche, quelques travaux enregistrent une température optimale de  $40^\circ\text{C}$  pour une décoloration maximale [13].
  - ✓ *Concentrations des réactifs Fenton*: l'augmentation des concentrations des réactifs Fenton ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entraîne une dégradation optimale avec une cinétique rapide. Cependant, un excès de ces réactifs affecte négativement l'efficacité du procédé. D'où, un compromis doit être élucidé en terme d'ajustement du rapport  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  [13, 14].
  - ✓ *Concentration des colorants* : plusieurs études montrent une proportionnalité inverse entre la dégradation des colorants et leurs concentrations. Cela est dû à plusieurs facteurs, comme la concentration des réactifs Fenton, et la structure de la molécule du colorant [13, 14].

#### D. Classification des procédés Fenton hybrides

En se basant sur l'utilisation d'énergie (électricité, ultrasons ou photons), les procédés Fenton se divisent en deux classes : le procédé Fenton conventionnel et leurs procédés

dérivés utilisant une source d'énergie. L'énergie provoque, donc, une amélioration de l'efficacité du procédé.

En effet, la combinaison de ces procédés constitue les procédés hybrides. Cette classification peut être décrite par les couleurs primaires et leurs combinaisons comme représenté sur la figure II.9 [13].



**Figure II.9.** Représentation des procédés hybrides de Fenton [13]

✓ *Procédé photo-Fenton* : c'est un couplage de la réaction Fenton avec l'irradiation des photons. La génération des radicaux hydroxyles est effectués à travers la réaction de photolyse de peroxyde d'hydrogène et la réaction de Fenton (réactions II.12 et II.16), respectivement.

Ainsi, aux valeurs de pH (2 à 4), l'ion ferrique se trouve en grande partie sous forme  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  (réaction II.25) qui, sous la lumière UV se réduit en solution aqueuse et produit le  $\text{HO}^\bullet$  supplémentaire et régénère l'ion  $\text{Fe}^{2+}$  (réaction.II.26) [13] :



Ce procédé est très intéressants dans la décoloration et la réduction du COT des colorants en particulier les colorants réactifs [13].

✓ *Procédé électro-Fenton* : Dans ce cas, il s'agit d'un couplage entre la réaction de Fenton et l'électrochimie. Le procédé électro-Fenton est basé sur la production en continu du peroxyde d'hydrogène par la réduction de l'oxygène sur la cathode selon la réaction (II.27):



Le fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est piégé dans le cycle d'oxydoréduction au niveau de la cathode pour produire le ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Par conséquent les réactifs Fenton sont produits continuellement en assurant la formation des radicaux hydroxyles.

✓ *Procédé sono-Fenton* : c'est la combinaison de la sonolyse avec le procédé Fenton, la réaction II.13 permet la production des radicaux hydroxyles. La production des ions ferreux et le peroxyde d'hydrogène se fait selon les réactions II.28 à II.30 [13].



✓ *Procédé photo-électro-Fenton*, dans ce système la solution est traitée sous les conditions du procédé électro-Fenton en l'irradiant afin d'accélérer la vitesse de dégradation des polluants par génération de grande quantité de radicaux libres [13, 14].

✓ *Procédé sono-électro-Fenton*, la haute efficacité de ce procédé est due à :

- L'électro-génération des  $\text{Fe}^{2+}$  et du  $\text{H}_2\text{O}_2$  au niveau de la cathode ;
- La génération supplémentaire des  $\text{OH}^\bullet$  par sonolyse ;
- La pyrolyse des composés organique sous l'effet d'ultrasons [13, 14].

✓ *Procédé sono-photo-Fenton*, les radicaux hydroxyles sont produits selon plusieurs réactions dans un mécanisme cyclique [14] :

- Sonolyse de l'eau (réaction II.14) ;
- Formation de peroxyde d'hydrogène par recombinaison des radicaux hydroxyle ;
- Formation des ions ferreux par sonolyse et photolyse à partir de la réaction entre les ions ferriques et le peroxyde d'hydrogène ;
- Photolyse directe de peroxyde d'hydrogène.

### II.3. Couplage du procédé Fenton et procédés biologiques

Les effluents de l'industrie textile contiennent un nombre de composés y compris les colorants et d'autres matières organiques qui sont des composés réfractaires, toxiques, difficilement ou non biodégradables. Ces mélanges ne peuvent pas être directement traités par les procédés conventionnels basés uniquement sur une activité biologique [16, 198]. Majoritairement, ces effluents nécessitent l'implantation couplée des méthodes alternatives d'oxydation avancées avec les méthodes biologiques pour une meilleure dépollution. Parmi ces méthodes, le système Fenton a été utilisé avec succès, car il conduit à une réduction de la DCO, et à la formation des sous-produits qui ne provoquent pas l'altération des micro-organismes et qui sont facilement biodégradables. Le traitement biologique permettrait, ensuite, de compléter l'épuration de l'effluent [15, 16].

---

Des études antérieures proposent pour le traitement des colorants des effluents textiles un tel couplage. Dans un batch séquentiel de traitement des colorants azoïques, les produits du procédé Fenton alimentent un traitement biologique par voie aérobie. Nilesh et al. (2006) [15] rapportent que le traitement Fenton permet une décoloration et une déaromatisation des colorants, tandis que la deuxième étape, conduit à une réduction en amines aromatiques. Cette combinaison séquentielle de type: Fenton- traitement biologique en aérobie ou Fenton-traitement biologique anaérobie est appliquée sur des colorants azoïques et anthraquinoniques.

Les colorants anthraquinoniques sont généralement non biodégradables, cependant une décoloration complète et une réduction de la DCO et de COT a été indiquée [16, 198].

Ainsi, un prétraitement biologique en amont d'un traitement Fenton peut être envisagé afin d'éliminer la proportion biodégradable de l'effluent et de rendre le deuxième procédé plus économique [16].

En ce qui concerne le couplage des procédés chimiques avec les procédés enzymatiques, très peu de travaux ont été signalés [199, 200].

#### **II.4. Conclusion**

Ces données bibliographiques mettent en évidence la présence des colorants dans les effluents industriels. Parmi ces colorants, les azoïques suivis par les anthraquinoniques, constituent la plus grande partie des colorants utilisée dans l'industrie textile. Néanmoins, leurs présence dans les rejets, provoque des effets indésirables dans le système aquatique. Leur élimination s'avère donc une réelle nécessité.

Une technique de traitement adaptée aux colorants doit, avant tout, dégrader les molécules et d'éviter la formation de sous-produits plus dangereux que les composés initiaux et plus particulièrement, empêcher la formation de produits cancérigènes.

Pour ce faire, l'utilisation des enzymes dans divers domaines industriels, y compris la transformation des colorants, présente donc un fort intérêt et explique les efforts effectués ces dernières années par la communauté scientifique dans ce sens. Cependant, elles restent des entités faisant partie du domaine du vivant et leur emploi nécessite de prendre certaines précautions notamment afin de conserver leur propriétés catalytiques. De plus, les peroxydases prennent de plus en plus une place importante dans les applications de transformation et de synthèse de molécules organiques.

---

Les POA et grâce à la production d'oxydants puissants (radicaux hydroxyle) sont capables de traiter les molécules de colorants, par destruction des groupes chromophores et par réduction du taux de matière organique non biodégradable. A l'instant, aucun procédé idéal adapté à la dégradation de tout type de molécule organique, n'existe. Le choix dépend du composé cible, de l'efficacité du procédé, de sa simplicité, son coût, et de sa sensibilité aux conditions expérimentales. Nous avons donc présenté dans le tableau II.5 une étude comparative résumant les principaux avantages et inconvénients des procédés de traitement des colorants. La combinaison entre les procédés est une idée récente, et semble être très efficace, en particulier, entre les POA et les procédés biologiques ou enzymatiques.

**Tableau II.5.** Comparaison des principaux procédés alternatifs de traitement des colorants  
[2, 201]

<b>Technique</b>	<b>Avantage</b>	<b>Inconvénient</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV</b>	-Source directe des radicaux hydroxyle ; -Applicables aux polluants liquides et solides -Activation par UV et/ou sel de fer Rendement quantique de photolyse ~1	Transport, stockage et manipulation de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Nécessité d'ajout de réactif chimique Efficacité et durée de vie de lampe limitée Coefficient d'absorption de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> faible Sous-produits d'oxydation inconnus Eaux usées troubles posent des problèmes
<b>Photocatalyse hétérogène</b>	Installation simple Efficace aux composés organiques	Rendement quantique faible Limitation de transfert de masse Efficacité et durée de vie de lampe limitée Eaux usées troubles posent des problèmes
<b>Procédé Fenton</b>	Oxydant puissant Applicable aux polluants liquides et solides Simple de mise en œuvre	Apport constant en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Sensible aux milieux anioniques Régénération limité du catalyseur Teneur du fer dans les produits de réaction
<b>Electro-Fenton</b>	Simple d'utilisation Minéralisation des composés aromatiques	Diminution d'efficacité du courant Production de H <sub>2</sub> aux fortes valeurs de courant Précipitation de Fe <sup>3+</sup> pour pH élevé
<b>Sono-chimique/ électrique</b>	Pas d'utilisation des produits chimique Techniques propres et vertes Indépendance de pH Bilan énergétique raisonnable Facilité d'installation.	Réactions secondaires et sous-produits incontrôlables Passage à l'échelle industrielle délicat Pas de minéralisation complète Cout relativement élevé.
<b>Enzymatique</b>	Très efficace pour la majorité des molécules organiques. Pas d'utilisation des réactifs chimiques toxiques. Procédé trop rapide.	Difficulté de récupération de l'enzyme Diminution d'efficacité due aux interférences.

# CHAPITRE III

---

## Matériel et méthodes

### III.1.Introduction

Dans les travaux publiés sur la décoloration des solutions de colorants par la méthode enzymatique, les peroxydases extraites des plantes (comme la HRP) et des microorganismes sont souvent utilisées. Cependant, ces deux voies ne sont pas rentables car pour l'utilisation de la HRP, la plante est difficilement cultivée en Algérie. Ainsi, le temps et le coût des procédés de fermentation sont élevés pour la deuxième [199]. Vu que la méthode d'extraction et de purification de l'enzyme à partir de la source choisie est simple et peu coûteuse, il est préconisé de rechercher des sources naturelles d'enzymes disponibles. Cette idée a été l'un des objectifs de cette thèse.

Pour cela la courgette de *Cucurbita pepo* a été testée pour l'isolement de la peroxydase nommée C-peroxydase.

D'autre part, et afin d'atteindre les autres objectifs ciblés, dans ce chapitre nous déterminons quelques propriétés de colorants JD 106 et BD 77. Puis, nous allons isoler, extraire et caractériser la peroxydase de courgette et étudier les effets de quelques paramètres sur la décoloration enzymatique, Ainsi la méthode d'oxydation chimique Fenton et le couplage des deux méthodes enzymatique et chimiques seront appliqués sur les deux colorants.

### III.2. Matériel

- ✓ Spectrophotomètre UV-visible de type Model Perkin-Elmer 550 A.
- ✓ pH mètre de type INOLAB.
- ✓ Balance électronique de type EU-C LCD.
- ✓ Centrifugeuse de type Hettich, EBA 20 ( 6000 tr.min<sup>-1</sup>).
- ✓ Spectroscopie IRTF-8400 de type SHIMADZU-8100-Japon.
- ✓ Bain-marie électrique avec agitation régulière et température réglable.
- ✓ CLHP de type shimadzu avec un détecteur UV (SPD10A) fixé à 254 nm et la colonne est C18.
- ✓ Les réactifs ainsi que les solutions tampon à différents pH utilisés lors cette étude sont cités en Annexe 2.

### ✓ Colorants

Les colorants choisis sont issus de 2 familles tinctoriales (colorants direct et dispersé) et chimiques (azoïque et anthraquinonique) distinctes, proviennent de l'industrie textile algérienne, SOITEX de Tlemcen.

#### ✓ *Jaune Direct 106*

Appelé aussi Jaune Solophényle, son nom chimique est : l'hexasodium 2-[3-sulfonato-4-[2-[2-sulfonato-4-[[3-sulfonato-4-[2-[2-sulfonato-4-(5-sulfonatobenzo[e]benzotriazol-2-yl)phenyl] ethenyl] phenyl] diazenyl] phenyl] ethenyl] phenyl] benzo [e]benzotriazole-5-sulfonate de sodium. C'est un colorant de Ciba Colors. Selon le Colour Index C.I. c'est le Jaune direct 106, son code est : C.I.40300, colorant direct, appartenant à la famille des azoïques, son numéro d'enregistrement est CAS 12222-60-5. Son apparence est une poudre jaune orange, assez soluble dans l'eau (20 g.L<sup>-1</sup> à 20°C) et son point de fusion se situe entre : 255 °C et 258 °C. Le JD 106 a pour formule chimique C<sub>48</sub>H<sub>26</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>6</sub>O<sub>18</sub>S<sub>6</sub>, sa masse moléculaire est égale à 1333.10 g.mol<sup>-1</sup>, et sa structure chimique développée est montrée sur la figure III.1.

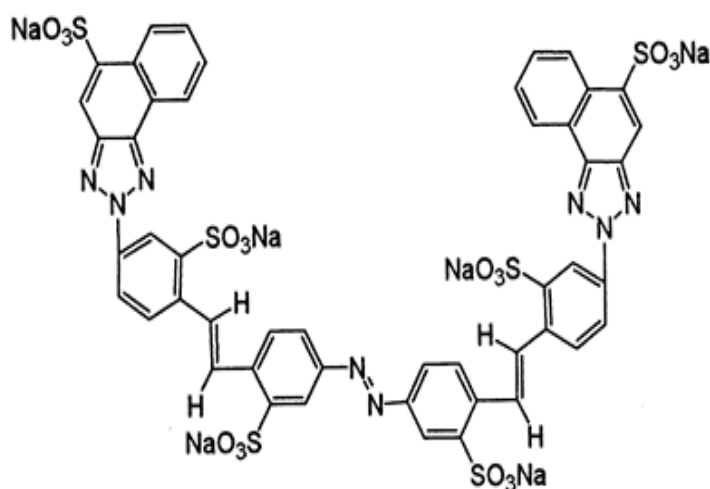
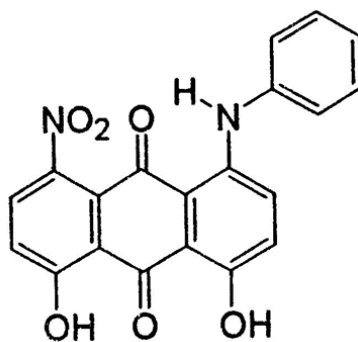


Figure III.1. Structure chimique de JD 106

#### ✓ *Bleu Disperse 77*

Il s'appelle aussi : Bleu Marine Bemaçon, son nom chimique est : 1,8-dihydroxy-4-nitro-5-anilinoanthraquinone et 1,8-dihydroxy-4-nitro-5-(phenylamino) anthraquinone. C'est un colorant de Bezema, selon le Colour Index C.I. son nom est bleu disperse 77 et son code

est : C.I.60766. Le BD 77 est un colorant dispersé, c'est une molécule organique appartenant à la famille des anthraquinones, son numéro d'enregistrement est CAS 20241-76-3. Son apparence est une poudre bleue, très peu soluble dans l'eau ( $0.01 \text{ g.L}^{-1}$ ) et son point de fusion se situe entre  $295^{\circ}\text{C}$  et  $300^{\circ}\text{C}$ . Le BD 77 a pour formule chimique  $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ , sa masse moléculaire est de  $376.32 \text{ g.mol}^{-1}$  et sa structure chimique développée est montrée sur la figure III.2.



**Figure III.2.** Structure chimique de BD 77

Des caractérisations spectrales par spectrophotométrie UV-visible et par spectroscopie infrarouge ont été réalisées et présentés en annexes 3 et 4.

Avant leurs utilisations dans les différentes expériences, ces deux colorants ont été préparés au laboratoire par dissolution dans l'eau distillée. En ce qui concerne le BD 77, le tween 20 (à  $1 \text{ mM}$ ) a été ajouté à la solution au moment de la préparation. Cependant, pour l'analyse par spectroscopie IRTF, l'utilisation de JD 106 et de BD 77 est sous forme de poudre.

### III.3. Méthodes expérimentales

#### *III.3.1. Isolement et purification partielle de la peroxydase*

##### **Principe**

Les enzymes sont des molécules protéiques très sensibles à leur environnement et peuvent perdre facilement, temporairement ou définitivement leurs propriétés biologiques. La précipitation (totale ou fractionnée) est l'une des méthodes les plus rapides qui permet de récupérer les protéines sous forme concentrée en gardant leurs propriétés biologiques.

L'utilisation des solvants organiques comme l'acétone est basée sur la différence de solubilité des macromolécules biologiques dans un solvant à basse température ( $0^{\circ}\text{C}$ ) [202].

### Mode opératoire

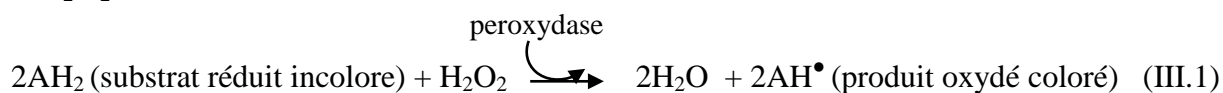
Une masse équivalente à 100 g de courgette (*Cucurbita pepo*) coupée en morceaux a été homogénéisée avec 200 ml de solution tampon phosphate (50 mM) pH 7 dans un mixeur pendant 5 minutes, le mélange est ensuite filtré sur une gaze pliées en multicouches. L'extrait obtenu est considéré comme une source de la peroxydase brute (EEB). Cet extrait subit ensuite une purification à l'acétone. La méthode de précipitation à l'acétone [203] a été appliquée par addition graduelle de 200 ml d'acétone pré-refroidi à 200 ml à l'extrait brut de la peroxydase. Le mélange est maintenu sous agitation à 0°C. La solution est ensuite centrifugée à 3000 tr.min<sup>-1</sup> pendant 10 min. Ensuite, le précipité est dissout dans 100 ml de solution tampon phosphate (50 mM) à pH 7, c'est l'extrait partiellement purifiée (EEPP). (Le protocole expérimental est illustré sur la figure III.3).

#### III.3.2. Caractérisation de la C-peroxydase

##### A. Dosage de l'activité enzymatique

###### Principe

Les peroxydases catalysent l'oxydation de nombreux substrats chromogènes en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction totale :

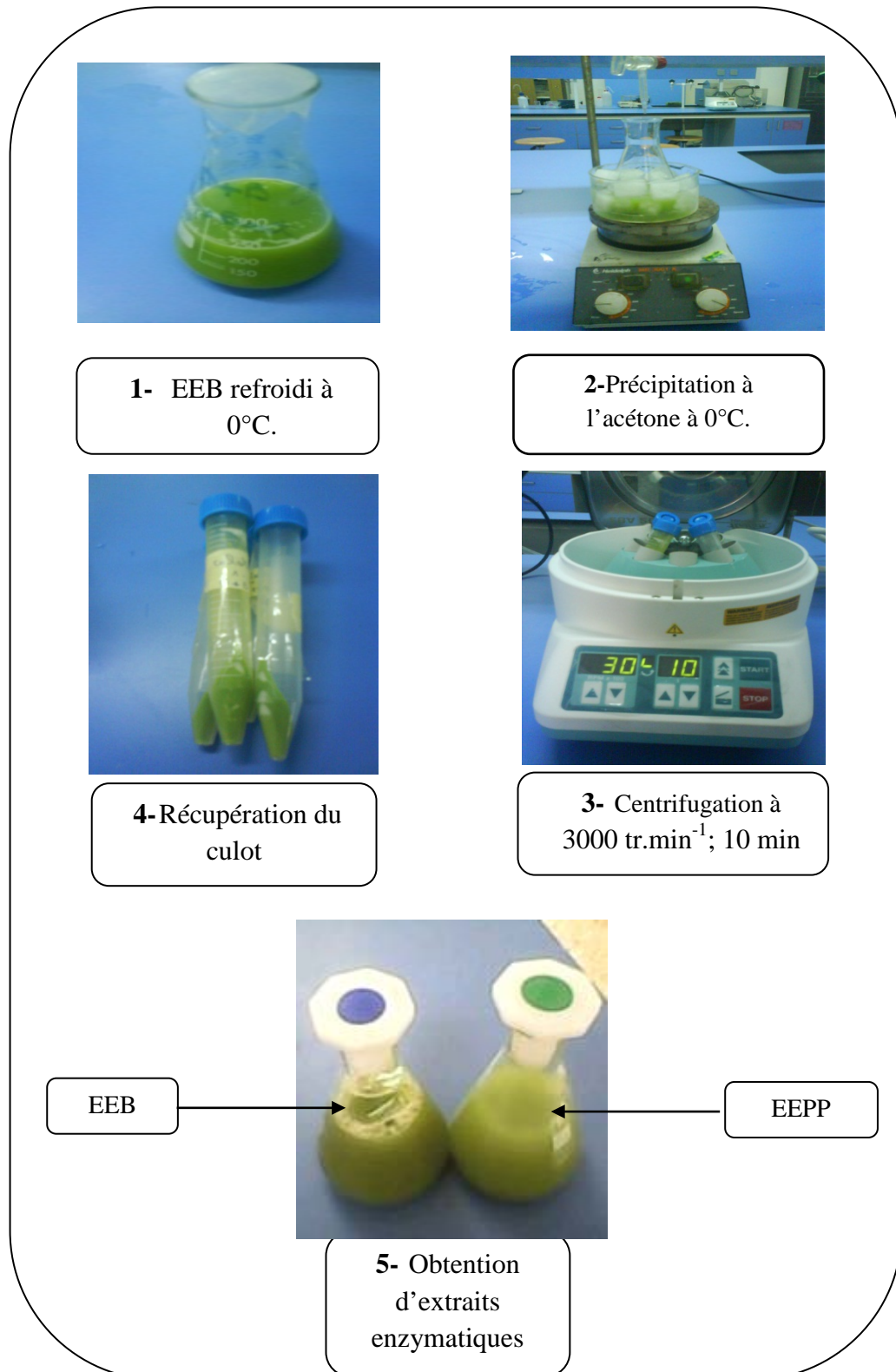


###### Mesure

La mesure d'activité peroxydasique basée sur le principe colorimétrique se fait par plusieurs méthodes. Parmi les quelles, celle avec le 4-aminoantipyrene, et en utilisant le phénol et le peroxyde d'hydrogène comme substrats, dans ce cas le produit de la réaction est le quinoneimine [204].

L'apparition de quinoneimine (produit coloré en rose), présente des caractéristiques d'absorption particulières dans la gamme visible à une longueur d'onde maximale de 517 nm ce qui permet de mettre en œuvre une technique de mesure d'activité enzymatique en continu. La vitesse initiale est alors déterminée à partir de la pente de la partie linéaire initiale de la courbe cinétique de transformation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenue par mesure de la DO après un temps t à 10 s d'intervalle (figure 5.1. de l'annexe 5). L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité de la peroxydase qui transfère 1 μmol du

peroxyde d'hydrogène par minute à 25°C, elle est exprimée en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour la forme libre, et en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  pour la forme immobilisée [205].



**Figure III.3.** Etapes de purification de la C-peroxydase

L'expression d'AE de l'enzyme en solution est calculée en utilisant l'équation :

$$AE = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \cdot \frac{V_m}{V_e \cdot \varepsilon_{517} \cdot D} \cdot 10^3 \quad (\text{III.2})$$

Avec :

$V_m$  : Volume de mélange réactionnel (ml) ;

$V_e$  : volume d'extrait enzymatique (ml) ;

$D$  : distance parcourue par les rayons lumineux (1cm).

Le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon_{517}$  est égal à 5440.804 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (selon la figure 5.2 de l'annexe 5).

La purification par acétone, est évaluée par la détermination de quatre paramètres : l'activité spécifique, l'activité totale, le rendement de purification et le facteur de purification, ces derniers sont définis comme suit :

$$AS = \frac{AE}{\text{Concentration des protéines}} \quad (\text{III.3})$$

$$AT = AE \cdot V_t \quad (\text{III.4})$$

$$RP = \frac{AT(\text{EEPP})}{AT(\text{EEB})} \cdot 100 \quad (\text{III.5})$$

$$FP = \frac{AS(\text{EEPP})}{AS(\text{EEB})} \quad (\text{III.6})$$

Avec  $V_t$  : volume total de l'extrait enzymatique purifié (ml)

La mise en évidence de la peroxydase de courgette est détaillée en annexe 5.

### B. Dosage des protéines totales

La quantité des protéines totales de chaque extrait est réalisée selon la méthode de Bradford (1976) [206]. Cette méthode est basée sur le changement de la couleur de bleu de Coomassie en fonction de la concentration des protéines.

La concentration des protéines est donc déterminée à l'aide d'une courbe étalon de sérum albumine bovin, en ajoutant 0.1 ml de sérum de différentes concentrations à 5 ml du réactif de bleu de Coomassie. La densité optique de chaque échantillon sera observée en mesurant l'absorbance à 595 nm.

---

Les échantillons des extraits enzymatiques de C-peroxydase sont analysés de la même manière que les solutions des protéines. Le mode opératoire de cette méthode est détaillé en annexe 6.

### C. Détermination du poids moléculaire moyen de C-peroxydase

C'est une séparation en fonction de la taille des protéines par utilisation d'un tamis moléculaire. Cette technique est appelée aussi la chromatographie d'exclusion ou la filtration sur résine Sephadex. Cette résine se présente sous forme de billes poreuses, très hydrophiles et gonflent dans l'eau.

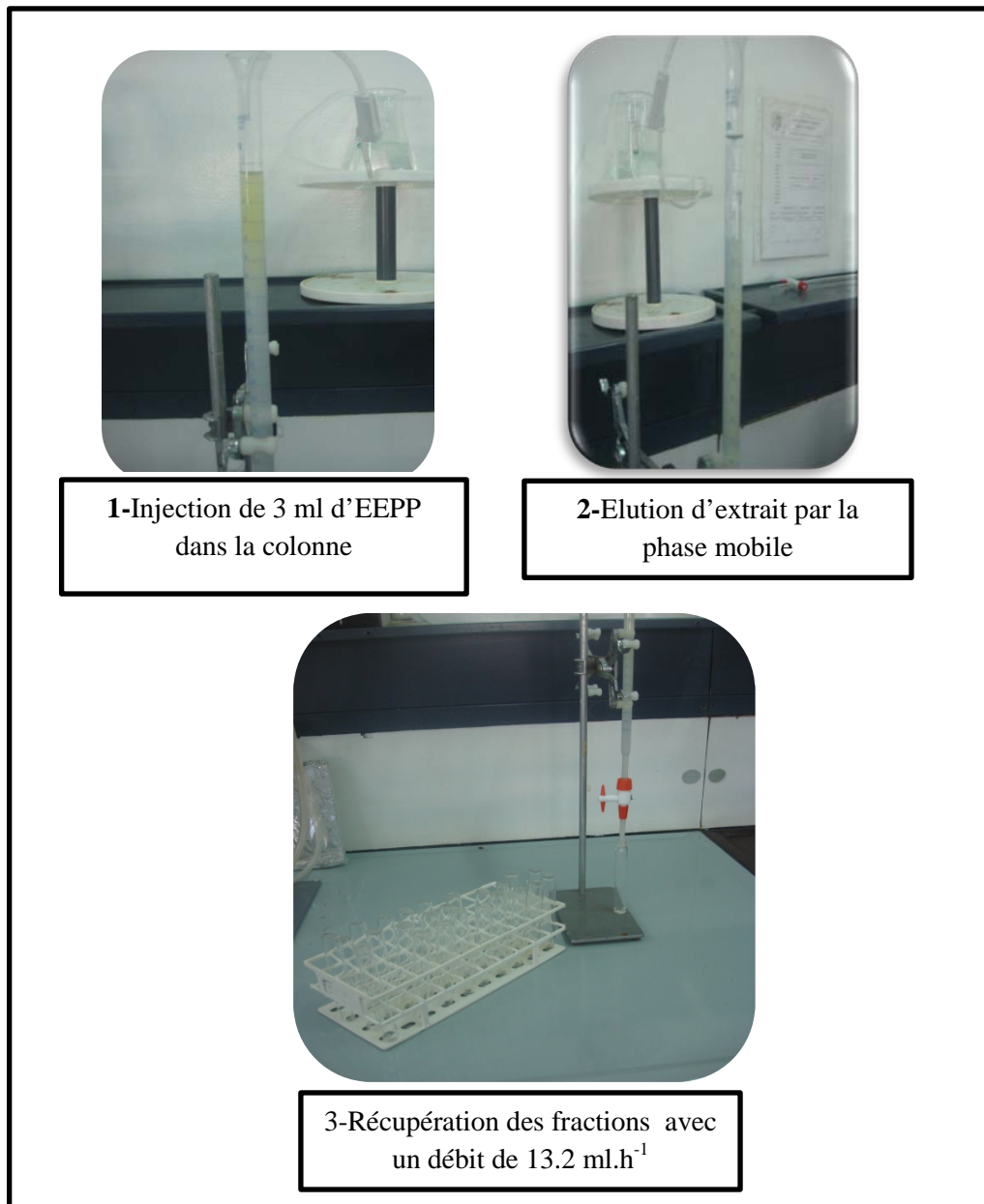
Le type de gel est choisi en fonction de son domaine de fractionnement (exprimé en terme de masse moléculaire), à l'intérieur de cette marge, les molécules peuvent être séparées les unes des autres.

Comme les peroxydases d'origine végétales possèdent un poids moléculaire allant de 28 à 60 kDa [137], la résine adéquate pour les séparer est le Sephadex G100 dont le domaine de fractionnement est de 4 à 150 kDa.

La première étape consiste à faire gonfler le gel avant son utilisation. Pour ce faire, 2 g de résine poudre est dissoute dans 40 ml d'une solution tampon phosphate (50 mM) pH 7 à la température ambiante, pendant 72 h. Une fois le gel est gonflé est dégazé, il est coulé d'une manière régulière dans une colonne (1 x 25 cm) et équilibrée avec la phase mobile qu'elle s'agit de même de tampon phosphate (50 mM) pH 7 pendant 15 minutes.

**Protocole 1:** 3 ml d'extrait enzymatique brut est injecté à l'intérieur de la colonne à l'aide d'une seringue. Après la diffusion de tout l'extrait dans le gel, l'élution par la phase mobile commence et le débit d'élution est maintenu lent et constant à 13.2 ml.h<sup>-1</sup> à l'aide d'une pompe péristaltique (Figure III.4).

Chaque fraction récupérée sera analysée par spectrophotomètre UV-visible, à la longueur d'onde de 280 nm, afin de doser les protéines contenues dans l'extrait enzymatique. Ensuite, et pour localiser l'ordre de fraction de la peroxydase, nous avons testé l'activité enzymatique de chaque fraction selon le protocole d'activité enzymatique de la peroxydase [204] et le profil d'élution sera représenté.



**Figure III.4.** Protocole d'élution sur gel Sephadex (détermination du poids moléculaire)

**Protocole 2 :** quatre solutions de protéines (ou enzymes) considérées comme standards, de poids moléculaire connu ( $\beta$ -amylase (PM= 200 kDa), SAB (PM = 66 kDa), cytochrome **c** (12.4 kDa), et HRP (PM = 44 kDa)) sont éluées dans la colonne. Pour chaque protéine (ou enzyme) on détermine le volume d'élution. Le volume mort est déterminé en utilisant le bleu dextran (PM = 1000 Da). L'évaluation du poids moléculaire de la C-peroxydase se fait à l'aide la courbe de variation de volume d'élution en fonction de logarithme décimale de poids moléculaire.

## D. Stabilité de la C-peroxydase

Afin de suivre la stabilité de la C-peroxydase en fonction du temps, un volume d'EEPP est conservé à la température 4°C pendant 3 mois.

L'expression de l'activité résiduelle de la peroxydase est donnée par :

$$AE_{rés} = \frac{AE}{AE_{max}} \cdot 100 \quad (III.7)$$

Avec:  $AE_{max}$ : Activité enzymatique maximale (UI.ml<sup>-1</sup>)

## E. Facteurs influençant l'activité enzymatique de la C-peroxydase

### E.1. Effet du pH

Le pH est l'un des paramètres d'importance sur l'AE des enzymes, il affecte l'ionisation des acides aminés, d'une part, et celle du substrat, d'autre part. Il a été démontré dans plusieurs études sur plusieurs peroxydases extraites de sources végétales variées que son AE est maximale dans une zone de pH acide ou neutre cela dépend de la durée de contact, du substrat testeur utilisé et du type de peroxydase.

Afin de montrer l'effet du pH sur l'AE de la C-peroxydase, nous avons utilisé au cours des opérations d'extraction et de purification, des solutions tampon de différents pH (2 à 10). L'étude s'est fait donc en présence du substrat donneur d'hydrogène : le phénol. L'AE est calculée à la température ambiante et le pH optimal correspondant à l'AE maximale est déterminé.

### E.2. Effet des ions métalliques

Plusieurs ions métalliques sont utilisés à une concentration de 10 mM pour tester l'AE de l'EEPP. Ces ions sont des cations (monvalent : Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>, divalent : Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> et Pb<sup>2+</sup> et trivalents : Fe<sup>3+</sup> et Al<sup>3+</sup>) provenant des sels suivants : NaCl, KCl, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, et de AlCl<sub>3</sub>. Ces solutions sont incubées avec l'EEPP pendant 5 min à pH optimal et à la température ambiante (20 à 25 °C).

### E.3. Effet de la température

Les peroxydases d'origine végétale sont fortement influencées dans les différents intervalles de température. Sur la peroxydase extraite de la courgette, cet effet est déterminé par mesure de l'AE en introduisant 5 ml de mélange réactionnel dans un bain

marie réglé à différentes température allant de 10°C à 70 °C pendant 15 min et au pH optimal.

### F. Immobilisation de la C-peroxydase

Le support ciblé pour l'immobilisation est l'alginate de calcium. la méthode appliquée est basée sur l'inclusion dans une matrice polymérique [207]. Le protocole d'optimisation est basé sur l'obtention des billes chargées d'enzyme avec une AEI maximale et un TF d'enzyme minimal.

**Protocole 1 :** pour une AE fixe, une masse d'alginate de sodum est dissoute dans 10 ml de solution d'EEPP (AE = 2.53 UI.ml<sup>-1</sup>), pour préparer une série de solutions alginate/C-peroxydase de concentrations : 1%, 2%, 3% et 4% (masse/volume). Les solutions sont homogénéisées par agitation pendant 2 h. Après, chaque mélange est goutté à l'aide d'une seringue dans 50 ml de solution de CaCl<sub>2</sub> de concentration déterminée. Finalement, une agitation de mélange à 250 tr.min<sup>-1</sup> pendant 2h sera réalisée. Les billes obtenues seront rincées avec l'eau distillée et conservées à 4°C.

**Protocole 2 :** à la concentration optimale d'alginate, et pour une AE de 2.53 UI.ml<sup>-1</sup>, l'enzyme sera immobilisé dans des solutions de CaCl<sub>2</sub> de concentrations égalent à 100, 200 et 300 mM. La suite du mode opératoire est respecté de la même manière que la protocole 1.

**Protocole 3 :** après l'optimisation des concentrations d'alginate et de chlorure de calcium, une serie de solution d'EEPP d'AE ayant les valeurs de : 0.45 IU.ml<sup>-1</sup>, 0.98 IU.ml<sup>-1</sup>, 1.4 IU.ml<sup>-1</sup> et 2.53 IU.ml<sup>-1</sup> seront immobilisées.

Les paramètres d'optimisation sont: l'efficacité d'immobilisation, le taux de fuite et l'activité retenue. L'estimation du taux de fuite de la C-peroxydase, se fait par la conservation des billes dans une solution de tampon phosphate (50 mM) pH 7 pendant 24 h. la détermination de l'AE de la solution de conservation est déterminée par la méthode colorimétrique en utilisant le 4-aminoantipérynne et le phénol.

La détermination des AE de la C-peroxydase sous formes libre et immobilisée :(AE<sub>0</sub> et AEI), du filtrat (AE<sub>F</sub>) et celle de tampon permet de calculer l'efficacité d'immobilisation, l'activité retenue et le taux de fuite selon les expressions suivantes [179, 208] :

$$EI(\%) = \left( \frac{AE_0 \cdot V_0 - AE_F \cdot V_F}{AE_0 \cdot V_0} \right) \cdot 100 \quad (III.8)$$

$$AR(\%) = \left( \frac{AEI.V_{imm}}{AE_0.V_0 - AE_F.V_F} \right) \cdot 100 \quad (III.9)$$

Le taux de fuite est calculé après 24 h:

$$TF(\%) = \left( \frac{AE_{tampon}^{t=24h} - AE_{tampon}^{t=0}}{AE_{tampon}^{t=24h}} \right) \cdot 100 \quad (III.10)$$

Avec :

$V_0$  : volume de l'enzyme à immobiliser (ml);

$V_F$  : Volume du filtrat (ml) ;

$V_{imm}$  : Volume d'enzyme immobilisée (ml).

**Protocole 4** : la C-peroxydase immobilisée est maintenue à la température de 4°C dans une solution tampon phosphate (50 mM) pH 7 pendant 2 mois. L'AE est testée par la méthode colorimétrique en utilisant le phénol.

**Protocole 5** : une caractérisation des billes de la C-peroxydase obtenues après optimisation des concentrations des agents d'immobilisation est réalisée par mesure du diamètre moyen.

### *III.3.3. Etude de décoloration par la C-peroxydase libre et immobilisée*

Dans le but de mettre en évidence les conditions optimales de la dégradation des colorants : JD 106 et BD 77 par les deux formes de la peroxydase libre et immobilisée, une étude a été mise en jeu. L'étude de la réaction enzymatique comprend d'une part l'effet des conditions opératoires telles que le pH, la température ainsi que la concentration des substrats et de l'enzyme, d'autre part.

Dans la présente partie, et pour étudier l'efficacité du procédé enzymatique sur la décoloration, nous respectons le mode opératoire suivant :

- Un volume réactionnel de 100 ml, contenant le colorant, le peroxyde d'hydrogène, l'enzyme et une solution tampon à pH donné. Ce mélange est soumis sous agitation magnétique à 300 tr.min<sup>-1</sup> pendant une durée déterminée à la température ambiante (20 à 25°C). L'arrêt de la réaction se fait par une désactivation de l'enzyme à l'aide d'un chauffage du mélange à une température de 85°C puis un refroidissement à 0°C.
- Ensuite, les mélanges sont centrifugés à 4000 tr.min<sup>-1</sup> pendant 10 min. Le surnageant obtenu est récupéré pour une lecture spectrophotométrique à la longueur d'onde maximale du colorant.

-Enfin, l'efficacité de décoloration est caractérisée par la détermination du rendement de décoloration (RD %) donné par l'expression III.11.

$$RD (\%) = \frac{DO_{\text{initiale}} - DO_{\text{finale}}}{DO_{\text{initiale}}} \times 100 \quad (\text{III.11})$$

Avec : la DO est mesurée à la longueur d'onde maximale de chaque colorant.

Cependant, la vitesse initiale de réaction enzymatique est définie par la pente à l'origine de la courbe de variation de concentration de substrat en fonction du temps, pour une concentration donnée de peroxyde d'hydrogène et d'enzyme.

L'expression de la vitesse initiale de décoloration est donnée par la relation III.12.

$$VID = \left( \frac{dC}{dt} \right)_{t=0} \quad (\text{III.12})$$

Ainsi, nous avons appliqué la méthode monofactorielle classique en variant un seul paramètre à la fois.

#### **A. Effet du pH**

Toute enzyme catalyse une réaction dans un intervalle de pH optimal dans lequel son activité est maximale. Par ailleurs, la dépendance au pH peut donner une indication quant au groupement impliqué dans le mécanisme réactionnel. Et ce, par exemple la protonation et la déprotonation d'un groupement à l'état actif ce qui peut conduire à une perte de son activité.

Les expériences ont été réalisées pour un mélange réactionnel décrit précédemment, en utilisant des solutions tampons de pH variant de 2 à 10 à la température ambiante pendant 1 h.

Les conditions opératoires sont fixées comme l'indique le tableau III.1.

**Tableau III.1.** Concentrations utilisées pour l'estimation du pH optimal pour la dégradation enzymatique des colorants

Colorant	Forme libre			Forme immobilisée		
	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	AE (UI.ml <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	AEI (UI.g <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)
<b>JD 106</b>	50	1.4	0.5	80	0.258	5
<b>BD 77</b>	80	1.05	10	180	0.88	20

**B. Effet du temps de contact**

Chaque réaction chimique ou enzymatique est caractérisée par un temps de contact nécessaire pour que les réactifs soient convertis en produits. Le temps de la réaction enzymatique étudiée est déterminé pour les deux formes de la peroxydase et cela par une étude cinétique pour différentes concentrations du colorant. Les concentrations de peroxyde d'hydrogène et d'enzyme sont données dans le tableau III.2.

Le temps de la réaction est atteint lorsque la concentration en colorant devient constante. Ce temps est déterminé au pH optimal.

**Tableau III.2.** Concentrations utilisées pour l'estimation du temps de contact de dégradation enzymatique des colorants

Colorant	Forme libre			Forme immobilisée		
	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	AE (UI.ml <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	AEI (UI.g <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)
<b>JD 106</b>	10-110	1.4	0.5	10-160	0.258	5
<b>BD 77</b>	8-200	1.05	10	15-200	0.88	20

**C. Effet de la température**

La température des réactions enzymatiques joue un rôle primordial dans la profil réactionnel, car elle intervient dans l'augmentation de l'énergie d'activation. Cependant, ce paramètre intervient aussi dans la dénaturation réversible ou irréversible des enzymes. A cet effet, notre étude porte aussi sur la détermination de l'effet de la température sur l'action de la C-peroxydase vis-à-vis les colorants.

Au pH optimal et aux concentrations des substrats et d'enzyme données sur le tableau III.1, (AEI pour le traitement de BD 77 est de  $0.5 \text{ UI.g}^{-1}$ ) de une série de mélanges réactionnels sont mises dans un bain marie maintenues à température constante: 20, 25, 30, 37, 40, 50, 60 et  $70^\circ\text{C}$  pendant une durée d'incubation suffisante.

#### D. Effet de la concentration initiale des colorants

Le colorant dans notre étude est le substrat principale de la réaction enzymatique. Les deux colorants étudiés appartiennent à deux familles chimiques différentes. L'étude de décoloration se fait d'une part par optimisation de la concentration qui correspond à un rendement et une vitesse de décoloration maximaux. D'autre part, la détermination des constantes cinétiques de la réaction enzymatique se fait par la méthode graphique de double inverse [209].

Le choix des intervalles de concentrations a été dicté par celles trouvées dans les rejets industriels de l'industrie textile ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  [13]).

Le tableau III.3. résume les conditions sous lesquelles l'étude de l'effet de la concentration initiale des colorants a été menée.

**Tableau III.3.** Conditions opératoires utilisées pour l'étude de l'effet de la concentration initiale de colorant sur la cinétique de dégradation enzymatique

Concentration	Forme libre			Forme immobilisée		
	Colorant ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	AE ( $\text{UI.ml}^{-1}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ (mM)	Colorant ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	AE ( $\text{UI.g}^{-1}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ (mM)
<b>JD 106</b>	10-110	1.4	0.5	10-160	0.258	5
<b>BD 77</b>	8-208	0.8	10	16-220	0.88	20

#### E. Effet de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène

Comme son nom l'indique la peroxydase quelque soit son origine, nécessite la présence de peroxyde d'hydrogène dans l'action enzymatique et plus précisément dans le cycle catalytique.

Afin de montrer l'effet de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène sur la dégradation enzymatique des colorants, quatre séries de mélange réactionnel contenant une

concentration optimale en colorant et une concentration donnée d'enzyme sont préparées. Ces mélanges sont portés à pH optimal.

Les intervalles de variation des concentrations de  $H_2O_2$  et les activités enzymatiques utilisés sont donnés dans le tableau III.4.

**Tableau III.4.** Valeurs de concentration de  $H_2O_2$  et d'enzyme utilisées dans le procédé de traitement des colorants.

Colorant	Forme libre		Forme immobilisée	
	Intervalle de concentration de $H_2O_2$ (mM)	AE (UI.ml <sup>-1</sup> )	Intervalle de concentration de $H_2O_2$ (mM)	AE (UI.g <sup>-1</sup> )
<b>JD 106</b>	0.1-7.5	1.4	0.1-200	0.258
<b>BD 77</b>	2-80	0.8	0.5-200	0.88

#### F. Effet de l'AE

Sous les conditions optimisées de pH et de concentrations en colorants et en  $H_2O_2$ , une étude a été menée pour la détermination de l'activité enzymatique optimale donnant la meilleure efficacité de décoloration. La variation de l'AE est réalisée à partir d'une solution mère ayant une activité constante à partir de laquelle un volume précis est ajouté au mélange réactionnel. Dans le cas l'enzyme immobilisée, une masse fixe de billes a été introduite.

Les intervalles de variation de l'AE pour les deux formes de l'enzyme sont résumées dans le tableau III.5.

**Tableau III.5.** Valeurs d'AE utilisées dans le procédé de traitement enzymatique

Colorant	Forme libre	Forme immobilisée
	Intervalle d'AE (UI.ml <sup>-1</sup> )	Intervalle d'AE (UI.g <sup>-1</sup> )
<b>JD 106</b>	0.16-3	0.025-0.61
<b>BD 77</b>	0.1-3.25	0.02-1.48

### G. Effet des effecteurs chimiques

Les effluents textiles contiennent souvent des éléments métalliques ce qui rend nécessaire l'étude de l'effet de certains cations métalliques tels que  $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Al^{3+}$  sur l'AE envers le colorant.

Généralement, ces cations peuvent être des inhibiteurs ou activateurs pour la peroxydase.

La notion d'activation (TA%) ou d'inhibition (TI%) de la réaction de décoloration est exprimée en terme de variation de la VID :

$$TA (\%) = \frac{VID_{\text{avec activateur}} - VID_{\text{sans activateur}}}{VID_{\text{avec activateur}}} \cdot 100 \quad (\text{III.13})$$

$$TI (\%) = \frac{VID_{\text{sans inhibiteur}} - VID_{\text{avec inhibiteur}}}{VID_{\text{sans inhibiteur}}} \cdot 100 \quad (\text{III.14})$$

Le calcul des taux d'activation et d'inhibition se fait pour les deux colorants sous les conditions optimales de pH et de concentrations de colorant, de  $H_2O_2$  et d'enzyme.

### H. Utilisation des Batch successifs dans la décoloration

L'immobilisation de la peroxydase dans la matrice polymérique d'alginate permet la récupération aisée de l'enzyme et sa réutilisation. Pour ce faire, il est nécessaire de tester la rétention du pouvoir catalytique de l'enzyme en répétant le traitement de décoloration sous les mêmes conditions avec la même masse d'enzyme immobilisée. Pour ce faire, nous nous procédons au mode opératoire suivant :

Aux concentrations optimales de colorant (JD 106 ou BD 77), de peroxyde d'hydrogène, la réaction enzymatique est déclenchée par addition d'une AE optimale. Après une durée de réaction nécessaire pour chacun des colorants, les billes sont récupérées et rincées plusieurs fois avec l'eau distillée. En suite, elles sont réutilisées dans un nouveau mélange réactionnel dans les mêmes conditions. Le mélange est destiné à une analyse par spectrophotométrie pour la détermination du RD (équation III.11). Ce mode opératoire est répété plusieurs fois.

#### *III.3.4. Etude de décoloration par le procédé Fenton*

L'efficacité du système Fenton est fonction de plusieurs paramètres tels que le pH, la température, la concentration initiale en ions ferreux, en peroxyde d'hydrogène et en colorant.

En ce qui concerne la température, son effet sur la vitesse de production des radicaux HO<sup>•</sup> est peu significatif à cause de la faible énergie d'activation nécessaire aux réactions d'amorçage de la chaîne radicalaire mise en jeu dans le procédé Fenton [14, 210], d'où toutes les expériences seront réalisées à la température ambiante (20-25) °C.

L'objectif de la présente partie, est de montrer l'effet de ces conditions opératoires. Le mode opératoire est simple et comporte les étapes suivantes :

- Une solution de colorant de concentration déterminée est portée à un pH déterminé. Par la suite, le sulfate de fer de concentration donnée est introduit dans la solution de colorant. Le mélange est agité magnétiquement à une vitesse de 300 tr.min<sup>-1</sup> pour assurer la l'homogénéisation de la solution. Enfin, le peroxyde d'hydrogène est introduit pour lancer le procédé d'oxydation chimique.

- La réaction est arrêté par ajustement de pH par une solution de NaOH à 0.6 mol.L<sup>-1</sup> jusqu'à pH 9 à 10 à l'aide d'un pHmètre [198]. L'expérience est réalisée à la température ambiante.

A la fin, le mélange est filtré et le surnageant est analysé par spectrophotomètre UV-visible à la longueur d'onde maximale de chaque colorant afin de calculer le RD à partir de l'équation III.11.

### **A. Effet du pH**

Les expériences de l'oxydation Fenton se déroulent habituellement à pH acide [13-15]. Afin d'évaluer l'efficacité du procédé Fenton dans les milieux acides, nous respectons le même mode opératoire cité au paragraphe précédent, en considérant l'intervalle de pH allant de 2 à 6.

L'expérience consiste à préparer pour chaque colorant une série de mélanges réactionnels à différents pH contenant les concentrations suivantes: [colorant] = 50 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 8 mM et [Fe<sup>2+</sup>] = 1 mM pour le JD 106, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 10 mM et [Fe<sup>2+</sup>] = 2 mM pour le BD 77. Les expériences sont réalisées à la température ambiante (20 à 25 °C) pendant 20 min.

Le pH optimal correspond à un rendement de décoloration maximal.

### **B. Effet de la concentration initiale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Les expériences sont réalisées sous les mêmes concentrations en colorant et en ions ferreux. L'intervalle de variation des concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'étend entre 0.5 et 16 mM

pour le JD 106 et entre 1 et 15 mM pour le BD 77. Les expériences sont réalisées à la température ambiante et pendant 20 min.

### **C. Effet de la concentration initiale de $\text{Fe}^{2+}$**

A partir des résultats précédents, aux valeurs optimales de pH et de concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nous procédons à l'étude de l'effet de concentration de catalyseur Fenton : ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) sur la décoloration du JD 106 et le BD 77. Dans ce cas les mélanges réactionnels contiennent  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de chaque colorant pour un intervalle de concentrations de  $\text{Fe}^{2+}$  allant de 0.125 à 10 mM pour l'étude de décoloration de JD 106 et allant de 0.25 à 7.5 mM pour l'étude de décoloration de BD 77.

### **D. Effet de la concentration initiale des colorants**

Les expériences précédentes permettent de fixer les conditions optimales de pH, de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'ions ferreux pour une concentration fixe de colorant. Le but de cette expérience consiste d'une part à l'optimisation de la concentration du colorant et d'autre part à une étude cinétique afin d'établir un modèle cinétique. A cette fin, les cinétiques de dégradation des colorants sont réalisées par variation de la concentration initiale variant de 10 à  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le BD 77 et de 10 à  $120 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le JD 106.

#### ***III.3.5. Décoloration par couplage enzymatique-Fenton***

Cette étude décrit le traitement des colorants étudiés précédemment par combinaison de l'oxydation chimique et enzymatique. L'un consiste en une oxydation homogène par la méthode Fenton aux conditions expérimentales déjà optimisées et le deuxième en utilisant les conditions optimales établies.

Le couplage se fait d'une manière séquentielle ou simultanée :

- ✓ La première consiste en une étude de décoloration par les procédés séquentiels : traitement Fenton suivi du traitement par C-peroxydase libre et traitement par peroxydase libre suivi du traitement Fenton.
- ✓ La deuxième étape consiste en un traitement simultané Fenton et enzymatique par peroxydase libre et par Fenton et peroxydase immobilisée.

Dans chaque étape, une optimisation des concentrations d'ions ferreux et d'AE pour les deux types de combinaison est réalisée.

### A. Décoloration par combinaisons séquentielles

Cette étude consiste en la détermination des effets des AE et des ions ferreux sur la décoloration au pH optimal. Ce dernier paramètre est fixé pour le procédé appliqué initialement. Le surnageant issu du premier procédé alimente le deuxième procédé.

**A.1. Procédé séquentiel Fenton-enzyme (F-E) :** Trois série de mélanges réactionnels pour chaque solution de colorant (à 50 mg.L<sup>-1</sup>), ont subit le traitement Fenton à différentes concentrations de Fe<sup>2+</sup> ( tableau III.6). La réaction est déclenchée par addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction a déroulée 20 min, puis est arrêtée par ajustement de pH (9 à 10). Après, un réajustement du pH à 2, ces surnageants seront traités par la C-peroxydase libre aux AE données dans le tableau III.6. la réactions se déroulera pendant 10 min. Ensuite les mélanges sont centrifugés, et les surnageants seront analysés par spectrophotométrie UV-visible.

**Tableau III.6.** AE et concentrations de Fe<sup>2+</sup> utilisées pour le traitement séquentiel : F-E

	AE(UI.ml <sup>-1</sup> )	Fe <sup>2+</sup> (mM)
<b>JD 106</b>	0.66-2.25	0.125-2.5
<b>BD 77</b>	0.4-2.5	0.125-1.25

**A.2. Procédé séquentiel enzyme-Fenton (E-F).** A pH 2, trois séries de mélanges réactionnels contenant le colorant et les doses en enzyme (tableau III.7) sont préparés pour chaque colorant. La réaction est déclenchée par addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Puis est arrêtée après 2 min. Les surnageants récupérés après centrifugation, subissent un traitement Fenton sous différentes concentrations en ions ferreux (tableau III.7) pendant 20 min. Les mélanges sont neutralisés puis centrifugés. En fin, les surnageants seront analysés par spectrophotométrie UV-visible.

**Tableau III.7.** AE et concentrations de Fe<sup>2+</sup> utilisées pour le traitement séquentiel : E-F

	AE(UI.ml <sup>-1</sup> )	Fe <sup>2+</sup> (mM)
<b>JD 106</b>	0.66-2.25	0.125-1
<b>BD 77</b>	0.4-2.5	0.25-2.5

### B. Décoloration par combinaison simultanée : C-peroxydase libre et Fenton

Pour chaque colorant, trois séries de mélanges réactionnels portés à pH 2, contenant 50 mg.L<sup>-1</sup> auxquelles est ajouté une dose de C-peroxydase libre, et différentes concentrations des ions ferreux, (tableau III.8). Les réactions sont déclenchées par addition d'une 8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( et de 10 mM pour le BD 77) et après 30 min, elles sont arrêtées par ajustement de pH (9 à 10) et par chauffage à 85°C suivi d'un refroidissement. A la fin, les mélanges sont centrifugés puis les surnageants sont récupérés pour analyse spectrophotométrique.

**Tableau III.8.** AE et concentrations de Fe<sup>2+</sup> utilisées pour le traitement simultané : C-peroxydase libre-Fenton

	AE(UI.ml <sup>-1</sup> )	Fe <sup>2+</sup> (mM)
<b>JD 106</b>	0.66-2.25	0.125-1
<b>BD 77</b>	0.4-2.5	0.125-1.25

### C. Décoloration par combinaison simultanée : C-peroxydase immobilisée et Fenton

Dans cette partie, le même mode opératoire que celui suivi pour le couplage simultané avec la peroxydase libre, mais en utilisant la peroxydase immobilisée dont les AEI sont données dans le tableau III.8.

**Tableau III.9.** Concentrations utilisées pour le procédé de combinaison simultanée : C-peroxydase immobilisée-Fenton

	AE (UIg <sup>-1</sup> )	Fe <sup>2+</sup> (mM)	Colorant (mg.L <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)
<b>JD 106</b>	0.16-0.5	0.125-2.25	80	100
<b>BD 77</b>	0.35-1.48	0.25-2.5	180	120

#### III.3.6. Caractérisation des sous produits de dégradation

Les surnageants issus des traitements individuels et des traitements de combinaison séquentielles et simultanée sont analysés par spectrophotométrie UV-visible.

L'analyse par IRTF se fait par un balayage du nombre d'onde de 500 à 4000 cm<sup>-1</sup> en utilisant la pastille de KBr des précipités récupérés après séchage à l'étuve à 60°C pendant 24 h. Une analyse par CLHP est réalisée sur les surnageants récupérés aux conditions optimales de chaque procédé individuel : enzymatique, Fenton et leurs combinaison avec la peroxydase libre. Pour cette fin, l'analyse par la phase mobile utilisée pour CLHP étant un mélange : Tampon pH 3/Acétonitrile aux proportions 60/40 respectivement avec un

débit de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  à une température de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Le volume d'injection étant de  $1 \text{ } \mu\text{l}$  et avec la colonne C18.

### *III.3.7. Test de phytotoxicité des surnageant sur les grains d'haricots*

Les effluents textiles colorés posent de sérieux problèmes à la santé et à l'environnement, ils peuvent être rejetés directement et rentrent donc dans les activités d'agriculture. Cependant, cela provoque des effets négatifs sur la vitesse de germination sur plusieurs plantes, ces dernières jouent un rôle important dans les fonctions écologiques et dégagent du carbone nécessaire à la fertilité de la terre [68]. Ceci, montre l'importance de tester la phytotoxicité des plantes par effluents colorés avant et après leurs transformations ou dégradation par l'estimation de certains paramètres de germination. L'indice de germination (IG) est une mesure relative à la germination des grains et l'élongation des racines. Dans des études antérieures, plusieurs espèces ont été utilisées dans les tests de phytotoxicité et il n'y a pas d'espèce généralisée dans le monde, dans notre étude nous avons ciblé les grains d'haricot, qui sont très utilisés en agriculture locale [211].

Le protocole des tests de germination est issu des normes relatives à l'essai d'inhibition de germination de semences par une substance et à la détermination des effets des polluants sur la flore du sol [212, 213]. Dans cette étude, des grains d'haricot (initialement de 10 grains) sont mises à germer sur des pots de sable issus d'un espace agricole de la région de Médéa. Un témoin est réalisé en utilisant de l'eau distillée. L'ensemble du système expérimental est placé dans un endroit de température ( $22^\circ\text{C}$  à  $25^\circ\text{C}$ ) et d'humidité considérées constantes. Le test est déclenché par arrosage de 10 ml de chaque solution dans le pot et le contrôle se fait chaque 24 h pendant 21 jours. Le nombre de graines germées est déterminé et chaque graine germée est ensuite mesurée en distinguant la partie aérienne et la partie racinaire. Une comparaison entre les différents échantillons pendant et après germination sera faite pour le témoin, le colorant et le surnageant. Le pourcentage de germination, la longueur relative des racines et l'indice de germination sont calculés selon les expressions suivantes [213] :

$$\text{PG (\%)} = \frac{\text{Nombre de grains germés dans l'essais}}{\text{nombre de grains germés dans le témoin}} \cdot 100 \quad (\text{II.16})$$

$$\text{LRR (\%)} = \frac{\text{longueur moyenne de racine de l'essais}}{\text{longueur moyenne de racine du témoin}} \cdot 100 \quad (\text{II.17})$$

$$\text{IG} = \text{PG} \cdot \text{LRR}/100 \quad (\text{II.18})$$

Ainsi, une mesure des longueurs des tiges sera effectuée.

# CHAPITRE IV

---

## Résultats et discussion

## IV.1. Caractérisation de C-peroxydase

### IV.1.1. Détermination des paramètres de purification

La procédure de purification de la C-peroxydase par l'acétone est évaluée par la détermination des paramètres donnés dans le tableau IV.1. Elle conduit à un facteur de purification proche de celui calculé après la purification de Mnperoxydase par l'acétone [214]. Dans les travaux réalisés par Guerrero et al. (2008) [180], un rendement de purification et un facteur de purification de 28.5 % et de 1.3 ont été atteints, respectivement, après la purification de la peroxydase de navet par précipitation à l'acétone.

**Tableau IV.1.** Résultats de purification de la peroxydase de *Cucurbita pepo*

Extrait enzymatique	AE (UI.ml <sup>-1</sup> )	AT (UI)	Concentration des protéines (mg.ml <sup>-1</sup> )	AS (UI.mg <sup>-1</sup> )	RP (%)	FP
<b>Brut</b>	2.19	538.74	2.63	0.83	100	1
<b>Partiellement Purifié</b>	1.39	139	1.24	1.12	25.8	1.34

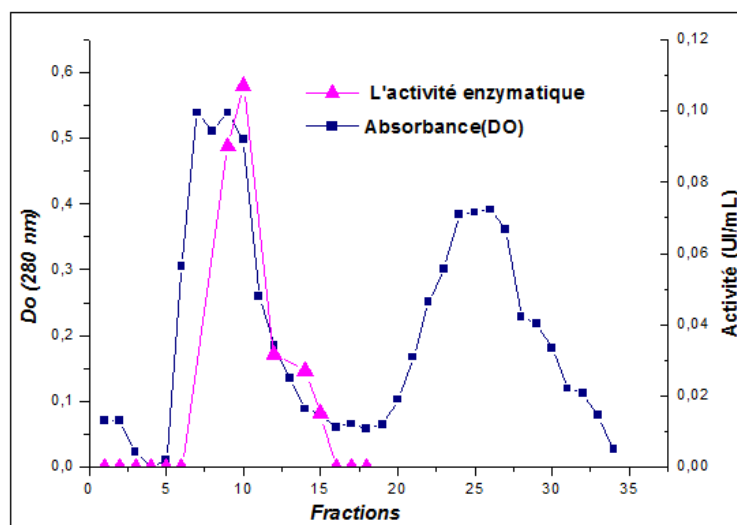
De ce tableau, il est clair que l'AE et la quantité des protéines diminuent tandis que AS et FP accroissent dans le cas d'une purification à l'acétone. L'étape de purification paraît donc nécessaire afin d'obtenir une enzyme potentiellement efficace dans le traitement des solutions colorées.

### IV.1.2. Poids moléculaire de la C-peroxydase

L'EEPP est élué dans une colonne de chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephadex G-100, à travers laquelle la couleur verte est séparée des protéines totales. Le profil chromatographique de l'EEPP révèle la présence de deux pics d'éluion, comme le montre la figure IV.1. Grâce à la mesure de l'AE des différentes fractions, l'AE maximale coïncide avec le premier pic. Ce dernier correspond, donc, à la peroxydase.

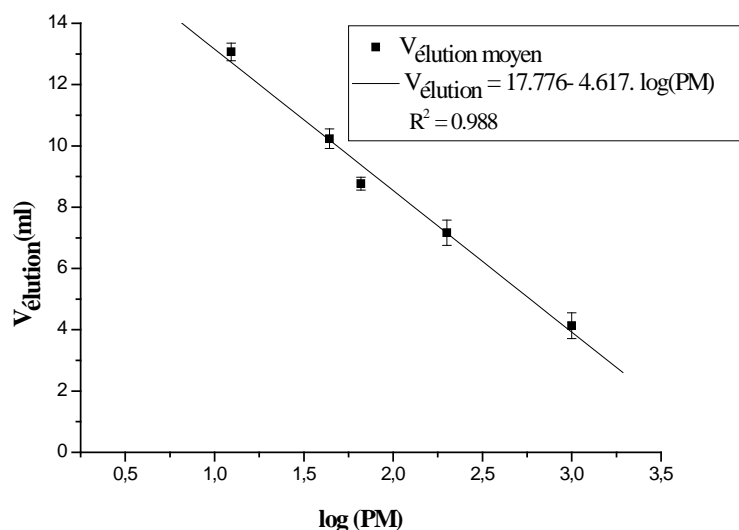
Le deuxième pic représente les protéines inactives qui se trouvent dans la courgette, leur éluion donne un pic relativement large par rapport à celui de la peroxydase.

D'après le profil d'élution, l'enzyme commence à éluer entre les fractions 7 et 14 après 13.68 min de diffusion de l'extrait dans le gel.



**Figure IV.1:** Profil d'élution de l'EEPP sur une résine Sephadex G-100

Ces fractions dotées d'une activité peroxydasique sont rassemblées et le mélange est utilisé pour la détermination du poids moléculaire de l'enzyme. La représentation de la variation des volumes d'élution des solutions protéiques en fonction du logarithme décimal du poids moléculaire est illustrée sur la figure IV.2.



**Figure IV.2.** Variation du volume d'élution en fonction de logarithme decimal du poids moléculaire

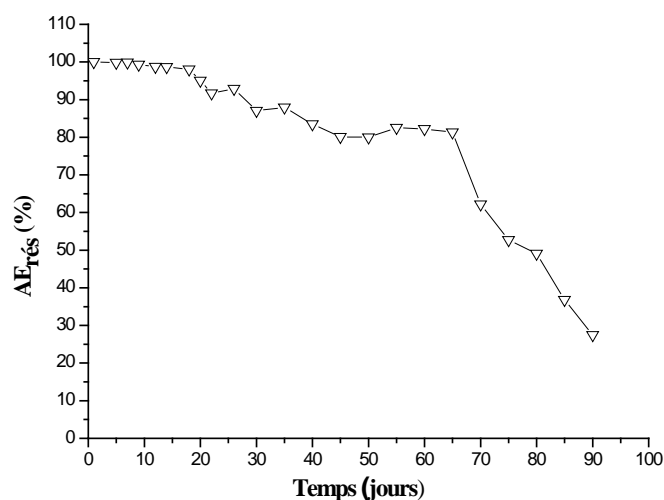
L'équation de la variation du volume d'élution des protéines (d'enzyme) en fonction du logarithme decimal du poids moléculaire permet de calculer ce dernier pour la C-

peroxydase. Pour un volume d'éluion de  $10.142 \pm 0.143$  ml, sa valeur est de  $45.015 \pm 3.1$  kDa. La comparaison de cette valeur avec celles données dans la bibliographie montre qu'elle est avoisinante aux poids moléculaires des peroxydases extraites d'orange (22-44 kDa) [215], de pomme de terre douce (40 kDa) [216], d'arachide (40-42kDa) [217], des roses de *Cynara scolymus* L ( 41,3-43,3 kDa) [218], de navet et de HRP (49 et 42.2-44 kDa respectivement), [219] et de courgette (38,8-41,2kDa) [220]. Robinson (1991) [221] a montré que le poids moléculaire de la plupart des peroxydases végétales est compris dans l'intervalle 40-50 kDa. Tandis que, Jouili et al. (2011) [137] donnent un intervalle plus large (28-60 kDa).

#### IV.1.3. Stabilité d'EEPP de C- peroxydase

La solution d'EEPP contient des fractions protéiques et non protéiques non éliminées pouvant modifier l'AE de la peroxydase, ce qui rend nécessaire de tester son AE à la température de conservation pour évaluer la perte en activité.

L'EEPP est conservé dans une solution tampon pH 7 à 4°C pendant 3 mois. Les résultats d'activité enzymatique résiduelle sont illustrés sur la figure IV.3.



**Figure IV.3.** Variation de l'AE<sub>rés</sub> de C-peroxydase en fonction du temps (pH 7, substrat : phénol et T<sub>ambiante</sub>)

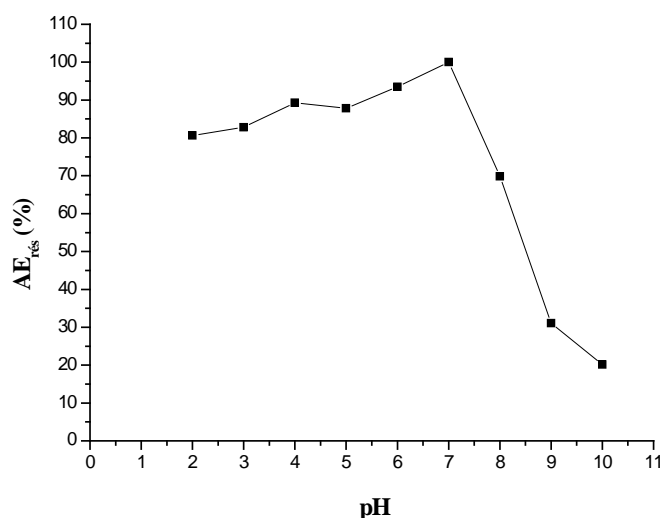
L'AE est préservée durant les 20 premiers jours de conservation. A partir de ce temps, une diminution non significative d'AE a lieu. Au fur et à mesure que le temps passe de 30 à 45 jours, l'AE commence à diminuer légèrement (perte de 12 %). Au bout de 65 jours, la C-peroxydase perd 17.33 % de son AE. A trois mois elle atteint une perte importante en activité (72.57 %).

#### IV.1.4. Facteurs influençant l'AE de la C-peroxydase

##### A. Effet du pH

L'activité des enzymes dépend essentiellement de la nature du substrat et elle est fortement affectée par le pH [175]. Sur l'enzyme, le pH intervient de deux manières différentes : par modification de la structure secondaire ou tertiaire de l'enzyme, ou par modification des charges électriques des radicaux des acides aminés du site actif.

Les résultats de la figure IV.4 montrent la variation de l' $AE_{rés}$  de la C-peroxydase en fonction du pH.



**Figure IV.4.** Profil de variation de l'activité résiduelle en fonction du pH.  
(  $[H_2O_2] = 0.01$  M,  $[phénol] = 0.01$  M,  $T_{ambiante}$  et temps de contact = 5 min)

- Lorsque le pH est  $7 < pH \leq 10$ , il se produit une perte en activité avec un maximum de 80% (à pH 10).
- Lorsque le pH est  $2 \leq pH < 7$ , il se produit aussi une perte en activité avec un maximum de 20 % (à pH = 2).

Avec le substrat phénol, l'EEPP présente donc un maximum d' $AE_{rés}$  dans la solution tampon phosphate (50 mM) pH 7.

Etant donné que l'AE de la peroxydase est déterminée pour de nombreux substrats, la variation de l' $AE_{rés}$  en fonction du pH est similaire aux celles de la HRP sur le substrat : o-dianisidine-HCl, BGP sur le substrat : guaiacol et de courgette sur le substrat hydroquinone, avec un optimum de pH ayant les valeurs de 5, 6 et 7, respectivement [222-224]. De Leonardis et al. (2000) [225] ont évalué l'effet du pH sur l'AE de la peroxydase extraite de pomme de terre et ils ont trouvé que le maximum d' $AE_{rés}$  est obtenu à pH 7.

### B. Effet des ions métalliques

La présence des ions métalliques affecte les réactions enzymatiques en agissant comme inhibiteurs ou activateurs. Afin de montrer cet effet sur la C-peroxydase, nous présentons les résultats des différentes valeurs d' $AE_{rés}$  dans le tableau IV.2.

**Tableau IV.2.** Effet de la présence des cations métalliques sur l'AE (pH 7,  $[H_2O_2] = 0.01$  M, [ phénol] = 0.01 M, temps de réaction = 5min et  $T_{ambiante}$ )

Cation métallique (10 mM)	$AE_{rés}(\%)$
En absence d'ions	100
$Na^+$	94.87
$K^+$	78.40
$Zn^{2+}$	84.54
$Al^{3+}$	95.22
$Fe^{2+}$	103.38
$Pb^{2+}$	107.01
$Ca^{2+}$	109.11
$Fe^{3+}$	120.55
$Mg^{2+}$	124.35

La C-peroxydase est légèrement influencée par la présence des cations :  $Na^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  et  $Al^{3+}$ , puisque l' $AE_{rés}$  n'a pas été modifiée de manière significative en présence de ces cations.

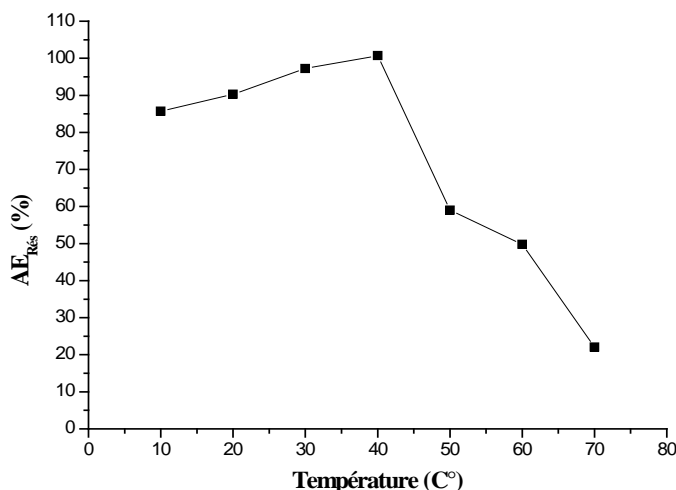
Pour les ions cationiques bivalents  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  et trivalent  $Fe^{3+}$ , l' $AE_{rés}$  est améliorée par leurs présence. Ces derniers cations agissent de la même manière comme les peroxydases extraites des feuilles de palme (*Phoenix dactylifera L.*) et de chiche noir [226, 227]. De plus, l'ion  $Fe^{3+}$ , constitue dans la majorité des peroxydases un ion d'activation [223, 226]. Cependant, l'AE est légèrement inhibée par la présence des ions  $K^+$  et  $Zn^{2+}$ , où l'AE décroît de 21.6 % et de 15.46 %, respectivement. Pour le cation monovalent, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus avec les peroxydases extraites de palme et de chiche noir [226, 227] et en désaccord avec celles extraites du thé et de la faux memosa [228, 229].

En ce qui concerne les ions  $Zn^{2+}$ , sur certaines peroxydases ils agissent comme activateur [226, 228], tandis pour d'autres jouent le rôle d'inhibiteur à la concentration de 1 mM [223].

En outre, il a été rapporté dans les travaux de Szigeti et al. (2008) [230] que les cations  $\text{Ca}^{2+}$  sont présents dans la structure des peroxydases. D'où, l'activation des enzymes par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  est due à la stabilisation de conformation de la peroxydase par ces ions.

### C. Effet de la température

Le deuxième paramètre physique qui affecte l'AE des peroxydases est la température, elle a un rôle crucial dans le déroulement des réactions enzymatiques. Des résultats sur l'existence d'une zone de température ou d'une température optimale pour une AE maximale des peroxydases ont été établis. L'illustration de cette dépendance pour la C-peroxydase dans cette étude est donnée sur la figure IV.5.



**Figure IV.5.** Profil de variation de l'activité résiduelle en fonction de la température (pH = 7,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.01 \text{ M}$ ,  $[\text{phénol}] = 0.01 \text{ M}$  et le temps de réaction = 5 min)

Entre les températures 10 et 40 °C, la peroxydase retient plus 86 % de son activité enzymatique avec un maximum à 40°C. Tandis qu'une perte est enregistrée au-delà de 40°C qui atteint plus de 80 % à 70°C. L'augmentation de la température (au-dessus de 40°C) provoque une diminution de l'AE<sub>rés</sub>, cela est due à la dénaturation et la modification de la conformation de l'enzyme. Ce résultat est proche de celui établi par plusieurs auteurs [226, 230].

La peroxydase extraite de la courgette présente, toute fois, une AE maximale dans la zone de température allant de 25 à 35 °C. La température ambiante peut être donc préconisée dans la suite de l'étude.

## IV.2. Immobilisation de la C- peroxydase

L'optimisation des paramètres liés aux conditions d'immobilisation : concentrations de  $\text{CaCl}_2$  et d'alginate de sodium ainsi que l'AE liée à la peroxydase a été étudiée. Les résultats sont rassemblés dans le tableau IV.3.

**Tableau IV.3.** Détermination des paramètres : EI, AEI, AR et TF des billes d'alginate obtenues sous différentes conditions d'immobilisation

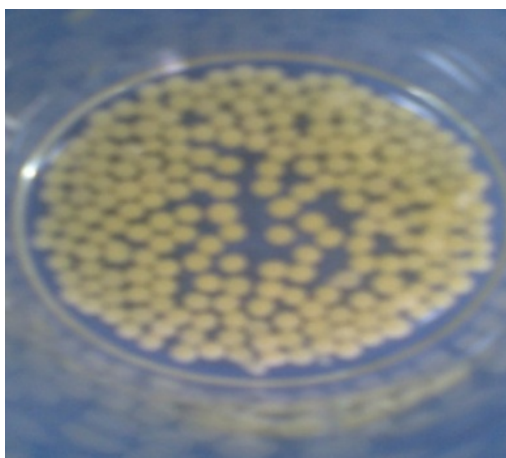
<i>Protocole 1</i>	<i><math>\text{CaCl}_2</math> (100 mM), AE = 2.53 UI.m<sup>-1</sup></i>			
	<i>Rapport : Alginate/solution (masse/volume)</i>			
	1 %	2 %	3 %	4 %
EI (%)	86.70 ± 4.94	90.43 ± 4.0	89.48 ± 3.06	92.48 ± 5.36
AEI (UI.g <sup>-1</sup> )	0.47 ± 0.04	0.37 ± 0.08	0,13 ± 0.02	0.02 ± 0.006
AR (%)	19.17 ± 1.69	16.16 ± 1.52	7.77 ± 1.05	5.99 ± 0.10
TF (%)	9.52 ± 0.05	4.97 ± 0.05	3.97 ± 0.01	1.25 ± 0.02
<i>Protocole 2</i>	<i>Rapport : Alginate/ solution (masse/volume) 2%, AE = 2.53 UI.m<sup>-1</sup></i>			
	<i><math>\text{CaCl}_2</math> (mM)</i>			
	100	200	300	
EI (%)	90.34 ± 4.01	82.42 ± 3.39	88.90 ± 4.55	
AEI (UI.g <sup>-1</sup> )	0.37 ± 0.08	0.41 ± 0.03	0.16 ± 0.01	
AR (%)	16.16 ± 1.52	13.64	13.76 ± 2.04	
TF (%)	4.97 ± 0.05	4.19 ± 0.38	4.95 ± 0.11	
<i>Protocole 3</i>	<i>Rapport : Alginate/ solution (masse/volume) 2%, <math>\text{CaCl}_2</math> (200 mM)</i>			
	<i>AE (UI.m<sup>-1</sup>)</i>			
	0.45	0.98	1.4	2.53
EI (%)	84.33 ± 49.5	90.69 ± 2.03	89.14 ± 3.59	82.42 ± 3.39
AEI (UI.g <sup>-1</sup> )	0.02 ± 0.001	0.22 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.41 ± 0.03
AR (%)	4.25 ± 1.65	22.77 ± 1.76	29.25 ± 2.41	13.64 ± 2.05
TF (%)	2.43 ± 0.06	2.19 ± 0.55	3.79 ± 0.13	4.19 ± 0.38

Les billes préparées aux faibles concentrations d'alginate et de  $\text{CaCl}_2$  (1 % et 100 mM) respectivement, présentent des valeurs maximales d'AEI, d'AR et de TF. Ces billes sont fragiles et l'enzyme diffuse facilement au sein de la solution de substrat. Cela peut être expliqué par une immobilisation incomplète résultant d'une distribution non uniforme de

l'enzyme [232]. Cependant, l'augmentation de la concentration d'alginate (de 1 à 4 %) influe faiblement sur la variation de l'EI (86.70 % - 92.48 %) mais AEI et AR diminuent. Il paraît que la dernière est liée à la contrainte de diffusion imposée par la couche polymérique au substrat [232, 233].

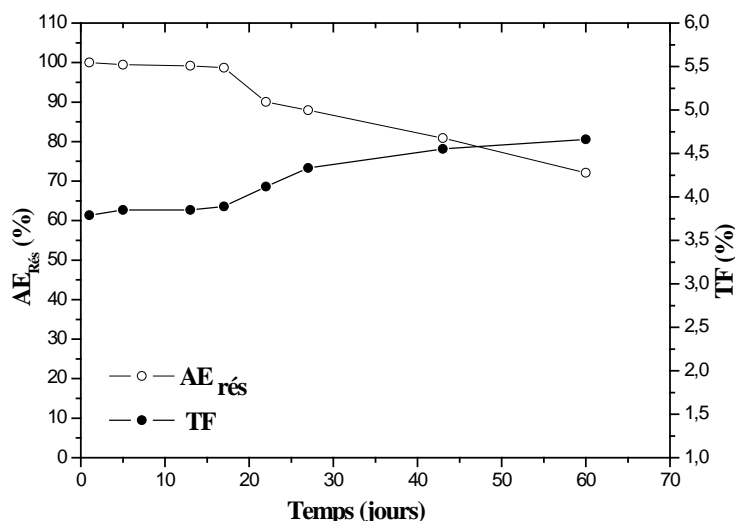
De plus, à une AE de  $2.53 \text{ UI.ml}^{-1}$ , aux fortes concentrations d'alginate et de  $\text{CaCl}_2$  les billes préparées sont rigides et sont caractérisées par EI et AR faibles. Toutefois, la variation d'AE pour des concentrations d'alginate et de  $\text{CaCl}_2$  de 2 % et 200 mM respectivement, montrent que AEI et AR augmentent avec augmentation de l'AE de 0.45 à  $1.4 \text{ UI.ml}^{-1}$ . Mais, pour une AE plus élevée ( $2.53 \text{ UI.ml}^{-1}$ ), l'AR diminue de 53.36 %.

Par conséquent, les conditions optimales conduisant aux maximums de EI, AR et au minimum de TF sont celles qui correspondent aux valeurs de : 2 %, 200 mM et de  $1.4 \text{ UI.ml}^{-1}$  d'alginate, de chlorure de calcium et d'AE respectivement. Les billes de C-peroxydase immobilisée sous les conditions optimales sont représentées sur la photo IV.1. Ces billes ont une forme sphérique de diamètre moyen de  $2 \pm 0.2 \text{ mm}$  estimé sur 10 billes de masse moyenne de 0.013 g.



**Photo IV.1.** Billes de C-peroxydase immobilisée dans les conditions optimales.  
([ $\text{CaCl}_2$ ] = 200 mM, [alginate de sodium] = 2% et AE =  $1.4 \text{ UI.ml}^{-1}$ )

Les billes préparées dans les conditions optimales d'immobilisation, sont conservées dans une solution tampon phosphate (50 mM) pH 7 à  $4^\circ\text{C}$  pendant une durée maximale de 2 mois. Des prélèvements ont été effectués et les valeurs de l' $\text{AE}_{\text{rés}}$  et de TF ont été calculées et représentées sur la figure IV.6.



**Figure IV.6.** Variation de l'AE<sub>rés</sub> et de TF des billes d'alginate en fonction du temps ([CaCl<sub>2</sub>] = 200 mM, [alginate de sodium] = 2 % et AE = 1.4 UI.ml<sup>-1</sup>)

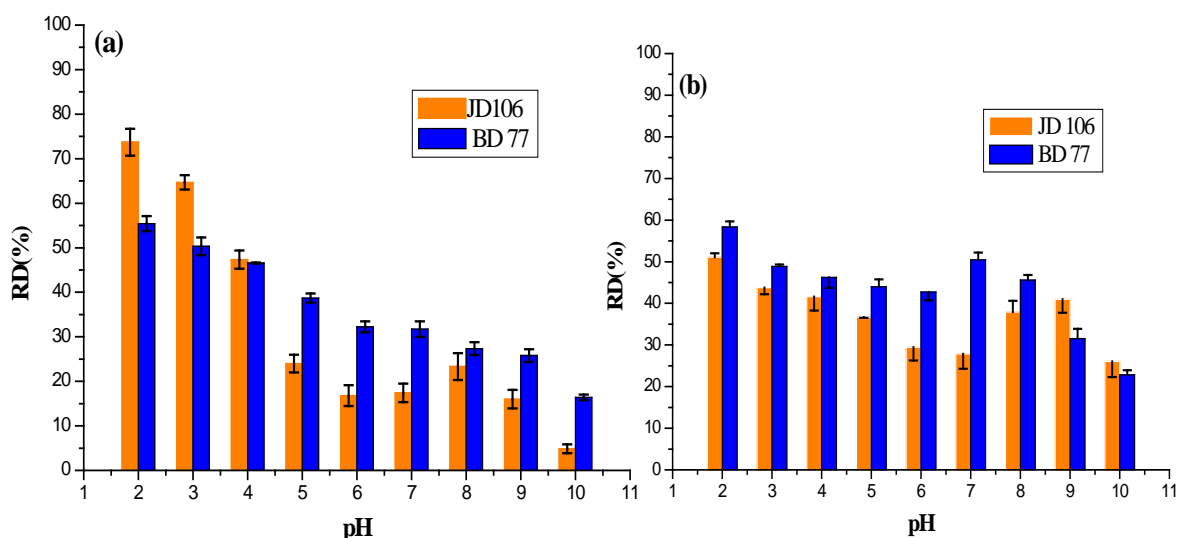
La C-péroxydase montre une stabilité en AE intéressante pendant sa conservation à la température de 4°C et dans une solution tampon pH 7. En effet, elle préserve plus de 90% de son AE initiale pendant 22 jours, avec un TF ne dépassant pas 4.11 %. Pour la Mnperoxydase immobilisée dans l'alginate de calcium, Iqbal et al. (2013) [234] estiment une AE<sub>Rés</sub> de plus de 68 % pendant 75 jours. L'immobilisation de HRP dans d'autres polymères synthétiques par greffage chimique, montre une durée de conservation de 46 jours à une température de 4°C.

### IV.3. Etude de décoloration par la C-péroxydase libre et immobilisée

#### IV.3.1. Effet du pH

La majorité des enzymes ont une valeur ou un intervalle de pH où l'AE est maximale pour un substrat donné.

Pour des mélanges réactionnels de traitement de JD 106 et de BD 77 aux conditions opératoires de concentrations des substrats et d'AE pour les deux formes de C-péroxydase libre et immobilisée, les variations des RD de traitement des différentes solutions en fonction du pH du milieu sont illustrées sur les figures IV.7.a et IV.7.b.



**Figure IV.7.** Effet du pH sur la décoloration de JD 106 et de BD 77 par la peroxydase : (a) libre et (b) immobilisée.

(Pour le JD 106 : [JD 106] = 50 mg.L<sup>-1</sup> et 80 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.5 et 5 mM et [AE] = 1.4 UI.ml<sup>-1</sup> et 0.258 UI.g<sup>-1</sup> pour la C-peroxydase libre et immobilisée, respectivement.

Pour le BD 77 : [BD 77] = 80 mg.L<sup>-1</sup> et 180 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 10 et 20 mM et [AE] = 1.05 UI.ml<sup>-1</sup> et 0.88 UI.g<sup>-1</sup> pour la C-peroxydase libre et immobilisée, respectivement, durée = 60 min et T<sub>ambiante</sub>)

#### ✓ Pour le traitement avec la C-peroxydase libre

1. **Cas du colorant JD 106 :** la décoloration dépend d'une manière significative du pH du milieu réactionnel. Le maximum de décoloration (73.71 %) est atteint à pH 2. Quand le pH augmente, le RD diminue pour atteindre 16.77 % à pH 6. Entre pH 6 et 9, le RD est légèrement influencé par l'augmentation de pH, il diminue fortement à pH 10 (4.87 %).

Des études antérieures rapportent que l'AE vis-à-vis des colorants atteint un maximum à pH acide. Mohan et al. (2005) [145], Bhunia et al. (2001)[134], Maddhinni et al. (2006) [146], De Souza et al. (2007) [128], Hidalgo et al. (2011) [64], Hamid et Rehman (2009) [10] et Jamal et al. [157] rapportent que les peroxydases extraites des plantes atteignent un maximum de décoloration des molécules azoïques dans une gamme de pH allant de 2 à 5. Pour des valeurs supérieures, la décoloration devient faible.

Le pH initial influe fortement sur la peroxydase ou sur l'un des deux substrats (molécule du colorant, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ce qui provoque une diminution du rendement [149, 231].

2. **Cas du colorant BD 77 :** selon la figure IV.7.a, le maximum de décoloration (55%) est atteint à pH 2, quand le pH augmente, le RD diminue pour atteindre 32.25 % à pH 6 puis se stabilise jusqu'à pH 9 et enfin diminue pour atteindre 16 % à pH 10.

Dans les travaux de Jamal et al. (2011) [157, 235] réalisés sur le traitement des colorants anthraquinoniques : bleu réactif 4 et bleu brillant remazol par les peroxydases de chou-fleur (*Brassica oleracea*) et de courgette (*Trichosanthes dioica*), un maximum de

décoloration a été atteint à pH 4. Aussi, le rouge d'alizarine a été décoloré avec un rendement de 99 % avec la chloroperoxydase à pH 3 [60]. Le maximum d'AE dans le milieu acide est dû probablement à la composition du site actif en amino-acides ionisables nécessaires aux substrats chargés [60].

En général, toutes les peroxydases d'origine végétale ont une AE maximale pour la décoloration située dans l'intervalle de pH allant de 2 à 5.5 [231].

✓ *Pour le traitement avec la C-peroxydase immobilisée*

**1. Cas du colorant JD 106** : l'augmentation du pH au-delà de 2 est défavorable à la décoloration (RD = 43.79 % à pH 3). Entre 2 et 7, le RD diminue jusqu'à 27.84 %. Dans la zone basique ( $7 < \text{pH} < 9$ ), le RD augmente de nouveau avec un maximum de 40 %.

Nos résultats sont en accord avec ceux publiés dans les travaux de Mohan et al. (2005)[145] pour la décoloration du noir acide 10 BX par la HRP.

**2. Cas du colorant BD 77** : dans ce cas, l'évolution de la décoloration est faiblement influencée par la variation du pH. A pH 2, le RD est maximum (58.34 %) et entre 3 et 7, le RD est au voisinage de 50%. Au-delà de pH 7, le RD diminue fortement (58.34 %) pour atteindre environ 22 % à pH 10.

Selon Akhtar et al. (2005) [153], la décoloration du réactif bleu 4 atteint un maximum de décoloration aux pH 3 et 4 pour la BGP libre et immobilisée, respectivement. Ces auteurs ont observé une diminution de RD de 45% à pH 7.

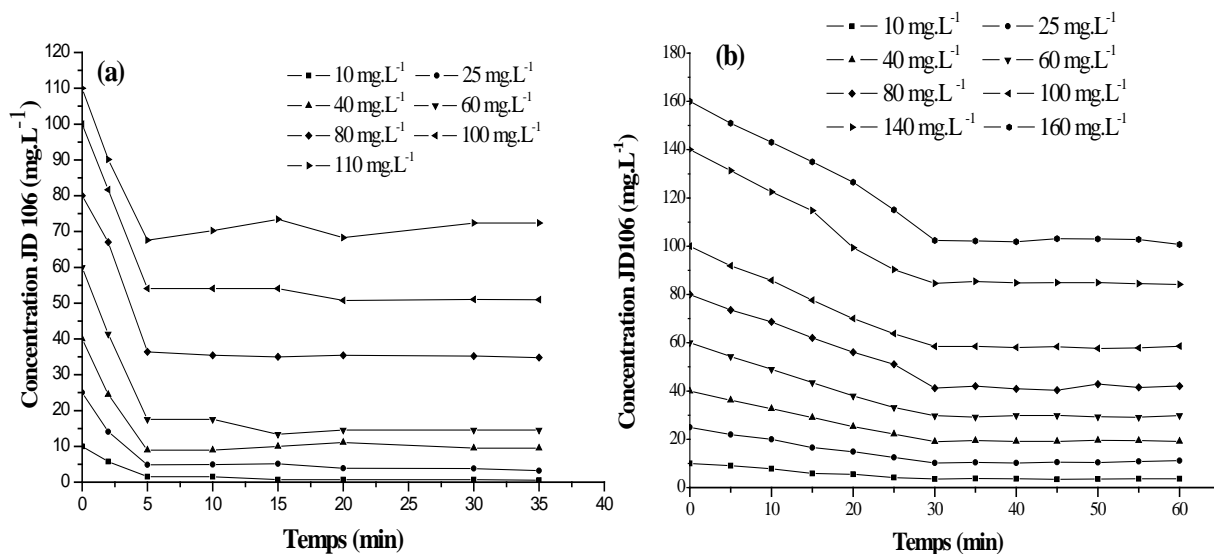
### *IV.3.2. Effet du temps de contact*

La vitesse initiale de décoloration dépend de la concentration initiale du colorant. Les figures IV.8 et IV.9 illustrent la variation de la concentration du JD 106 et de BD 77 en fonction du temps pour différentes concentrations initiales du colorant pour traitement avec la peroxydase libre et immobilisée.

**1. Cas du colorant JD 106** : à une AE de  $1.4 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ , une diminution de la concentration de colorant s'effectue pendant les 5 premières minutes pour toutes les concentrations initiales du colorant ( $10\text{-}110 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (figure IV.8.a). Cependant, après 5 min une faible variation des concentrations ait lieu, pour toutes les concentrations initiales de JD 106.

A la concentration initiale de  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , une réduction de concentration de plus de  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (RD de 80%) a été atteinte. Au bout de 5 min, plus la concentration initiale de colorant augmente plus la concentration résiduelle est importante. Cela peut être dû à

l'occupation de toutes les molécules d'enzyme par les molécules de JD 106 présentes dans la solution.



**Figure IV.8.** Cinétiques de décoloration de JD 106 par la C- peroxydase libre (a) et immobilisée (b).

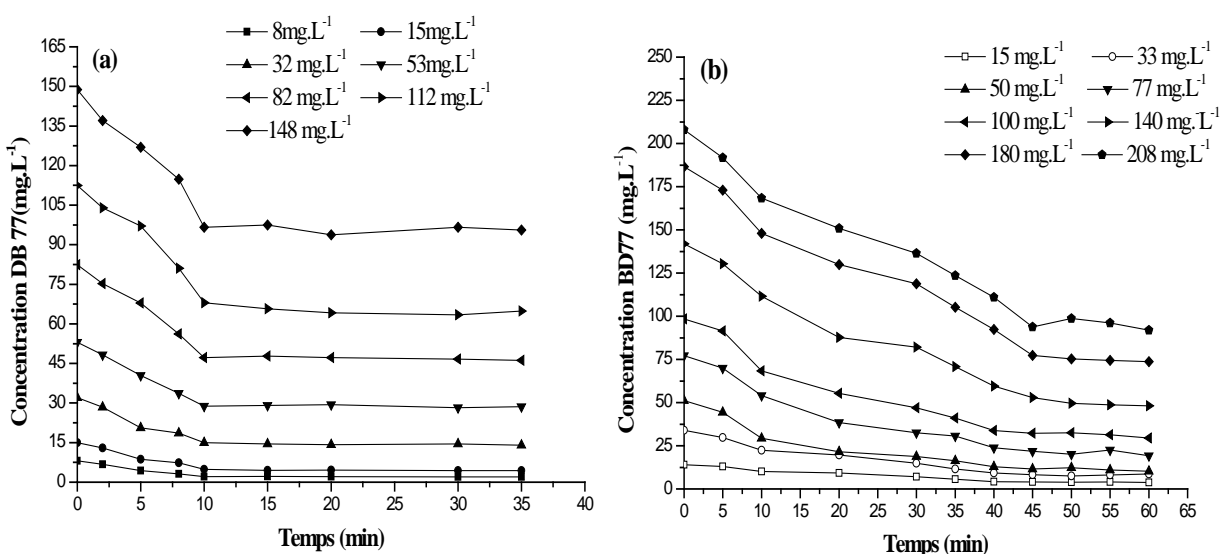
([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.5 et 5 mM et [AE] = 1.4 UI.ml<sup>-1</sup> et 0.258 UI.g<sup>-1</sup> pour la C- peroxydase libre et immobilisée, respectivement, pH 2 et T<sub>ambiante</sub>)

En ce qui concerne le traitement de JD 106 avec la C- peroxydase immobilisée, pour une AE de 0.258 UI.g<sup>-1</sup>, la vitesse de décoloration par la C- peroxydase immobilisée (figure IV.8.b) est plus lente que celle sous forme libre. Au bout de 30 min, la concentration résiduelle de la solution de JD 106 à 25 mg.L<sup>-1</sup> est de 19.05 mg.L<sup>-1</sup> alors qu'à 5 min, elle est que 22 mg.L<sup>-1</sup>. Ce phénomène est probablement dû aux limitations diffusionnelles manifestées dans la matrice d'alginate vis-à-vis ces molécules du colorant. Au-delà de 30 min de contact, il y a stabilisation de la concentration. Ces résultats sont semblables pour toutes les concentrations initiales.

**2. Cas du colorant BD 77 :** les cinétiques des réactions de décoloration (figures IV.9.a et IV.9.b) par la C- peroxydase en solution (AE de 1.05 UI.ml<sup>-1</sup>) et immobilisée (0.88 UI.g<sup>-1</sup>) sont plus lentes que celles du JD 106. Les molécules de BD 77 pendant les premières 10 min, sont transformées par la peroxydase libre et la concentration du colorant dans le mélange diminue. Au-delà de 10 min, la concentration ne varie pas beaucoup. Néanmoins, pour la forme immobilisée, le temps suffisant pour une décoloration maximale est de 45 min (plus élevé que celui obtenu avec JD 106).

Dans l'étude de décoloration du noir acide BX (colorant azoïque à 20 mg.L<sup>-1</sup>) par la HRP libre et immobilisée dans l'alginate et dans le polyacrilamide, Mohan et al. (2005) [145]

ont rapporté qu'un temps de 45 min était nécessaire pour les deux formes de l'enzyme. Ainsi, Preethi et al. (2013) [236], rapportent dans leurs travaux que le bleu acide 113 (à 30 mg.L<sup>-1</sup>) se décolore au maximum avec 0.08 UI de HRP libre au bout de 45 min et ce temps est encore plus élevé (210 min) pour la HRP immobilisée dans l'alginate. Ainsi, Alemzadeh et Nejati, (2009) [179] exigent un temps de 20 min et de 100 min pour une transformation maximale du phénol par peroxydase libre et immobilisée, respectivement. De ces essais, il faut souligner, que la durée de décoloration enzymatique par les peroxydases est liée à la nature de la molécule du substrat, sa concentration initiale, de l'AE et de la forme de l'enzyme (libre ou immobilisée).



**Figure IV.9.** Cinétiques de décoloration de BD 77 par :  
 (a) : la C- peroxydase libre et (b) : la C- peroxydase immobilisée  
 ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 10 et 20 mM et [AE] = 1.05 UI.ml<sup>-1</sup> et 0.88 UI.g<sup>-1</sup> pour la C- peroxydase libre et immobilisée, respectivement, pH 2 et T<sub>ambiante</sub>)

### IV.3.3. Effet de la température

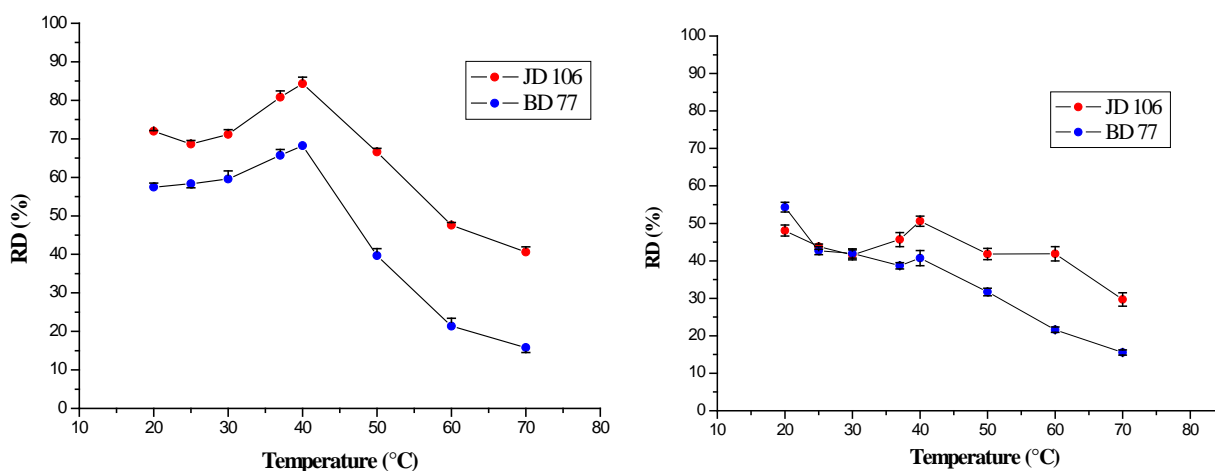
Toutes les réactions enzymatiques dépendent de la température, cet effet est dominant dans le cas du traitement avec la C- peroxydase libre qu'avec la C- peroxydase immobilisée (Figures IV.10.a et IV.10. b). L'AE maximale est atteinte à la température de 40°C et elle reste acceptable dans la zone 30-40°C.

Dans le cas de la C- peroxydase libre, la décoloration des deux colorants est maximale à T = 40°C. Pour des températures inférieures à 40°C, le RD reste supérieur à 50 %, par contre, pour des températures supérieures à 40°C, le RD diminue.

Les températures situées entre 20 et 40°C restent toute fois acceptables pour la décoloration des deux colorants.

Dans ce cas, le RD est inférieur à 50 % pour toutes les températures étudiées (20-70°C). La décoloration par la peroxydase immobilisée dans l'alginate semble être indépendante de la température, il y a donc une stabilisation thermique de la peroxydase [174].

Ce phénomène de stabilité a été étudié par Guerrero et al. (2008) [180] qui constataient que l'immobilisation de la peroxydase de navet dans les billes d'alginate permis de retenir plus de 70 % de son AE à 70°C.



**Figure IV.10.** Effet de la température sur la décoloration de JD 106 et BD 77 par :  
(a) : peroxydase libre et (b) : peroxydase immobilisée

(Pour le JD 106 : [JD 106] = 50 mg.L<sup>-1</sup> et 180 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.5 et 5 mM et [AE] = 1.4 UI.ml<sup>-1</sup> et 0.258 UI.g<sup>-1</sup> pour la C-peroxydase libre et immobilisée, respectivement et pH 2.

Pour le BD 77 : [BD 77] = 80 mg.L<sup>-1</sup> et 180 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 10 et 20 mM et [AE] = 1.05 UI.ml<sup>-1</sup> et 0.5 UI.g<sup>-1</sup> pour la C-peroxydase libre et immobilisée, respectivement et pH2)

D'après la bibliographie, la température 40°C est la température optimale de traitement des colorants azoïques, anthraquinoniques, des composés phénoliques et des effluents textiles par la BGP libre et immobilisée [135, 153, 155].

Plusieurs études ont prouvé que la décoloration/dégradation des colorants textiles par différentes peroxydases libres d'origine végétale est maximale dans l'intervalle de température variant de 25 à 50°C [150, 157, 231].

De ce fait, l'inactivation thermique de l'enzyme aux températures élevées est dûe à deux facteurs : réactions entre le peroxyde d'hydrogène et les intermédiaires produits du cycle catalytique, et réactions irréversibles entre l'enzyme et les radicaux libres [237].

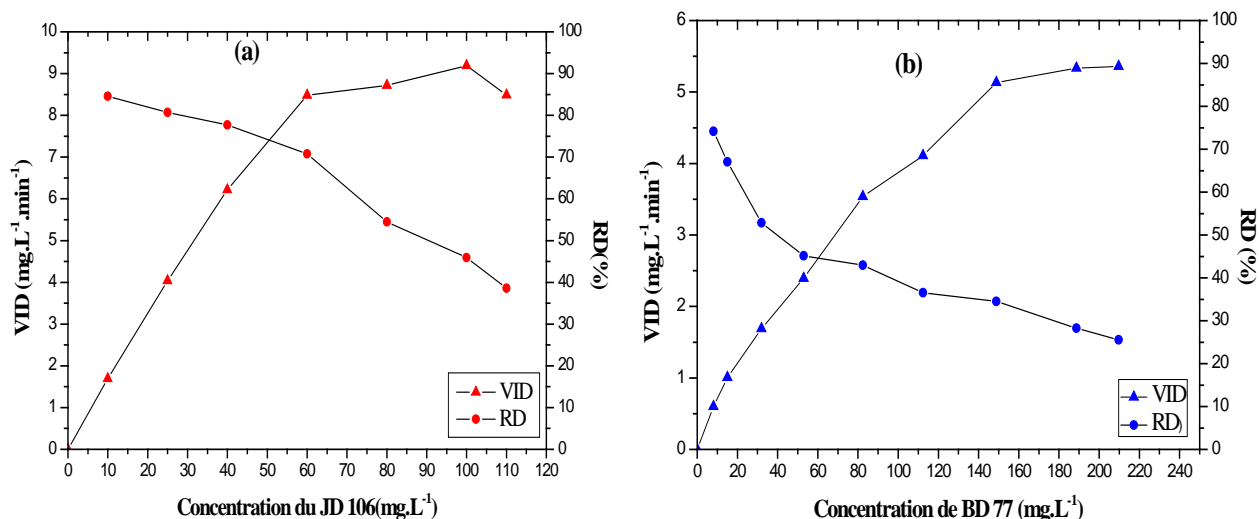
### IV.3.4. Effet de la concentration initiale des colorants

Les réactions enzymatiques sont fortement influencées par la concentration du substrat (pour une AE donnée); si la concentration du colorant augmente, la VID augmente mais le RD diminue, cette dépendance est bien illustrée pour les deux colorants sur les figures IV.11 et IV.12.

#### ✓ Pour le traitement avec la C-peroxydase libre

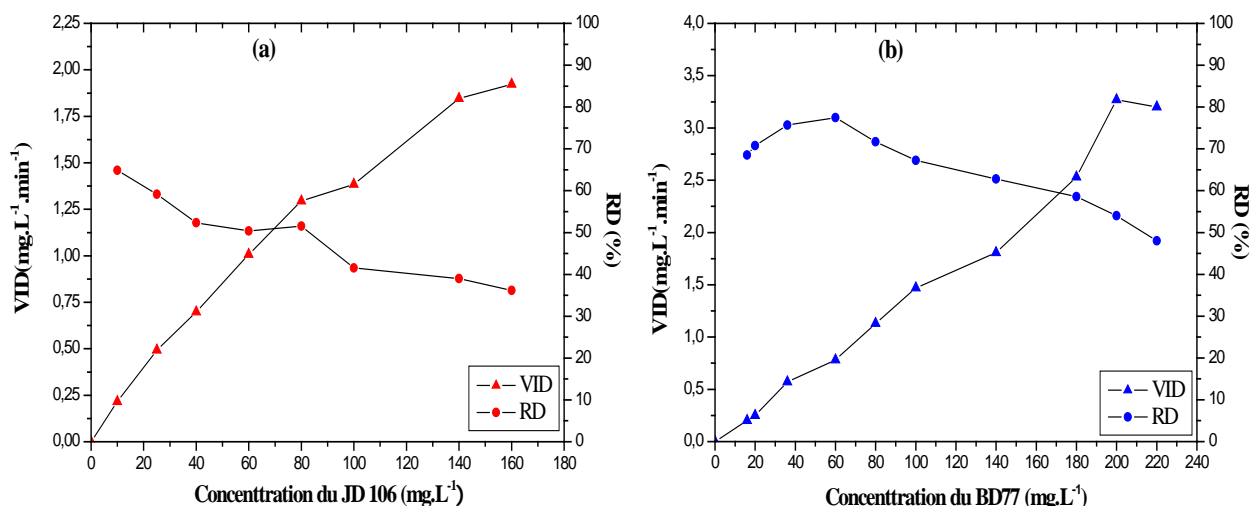
Le RD du BD 77 est maximum pour des faibles concentrations de colorant ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ), et diminue avec l'augmentation de la concentration jusqu'à la concentration de  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  et la VID tend à croître avec la concentration jusqu'à ce qu'elle atteigne la valeur  $5.13 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  à  $140 \text{ mg.L}^{-1}$ .

La VID du JD 106 atteint une valeur maximale de  $8.48 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  correspondante au RD de 70.74% pour une concentration de  $60 \text{ mg.L}^{-1}$ . Pour les fortes concentrations, il n'y a pas de variation significative de VID, c'est le point de saturation de l'enzyme par les molécules du colorant. La concentration pour laquelle la décoloration est maximale correspond à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le JD 106 et  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le BD 77.



**Figure IV.11.** Effet de la concentration initiale du colorant sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b) par la peroxydase libre

(Pour le JD 106 :  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.5 \text{ mM}$  et  $[\text{AE}] = 1.4 \text{ UI.ml}^{-1}$ , pH 2 et durée = 5 min  
et Pour le BD 77 :  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mM}$  et  $[\text{AE}] = 0.8 \text{ UI.ml}^{-1}$ , durée = 10 min, pH 2 et  $T_{\text{ambiante}}$ )



**Figure IV.12.** Effet de la concentration initiale du colorant sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b) par la peroxydase immobilisée

(Pour le JD 106 :  $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$  et  $[AE] = 0.258 \text{ UI.g}^{-1}$ , pH 2 et durée = 30 min

Et Pour le BD 77 :  $[H_2O_2] = 20 \text{ mM}$  et  $[AE] = 0.88 \text{ UI.g}^{-1}$ , durée = 45 min, pH 2 et  $T_{\text{ambiante}}$ )

✓ **Pour le traitement avec la C-peroxydase immobilisée**

1. **Cas du colorant JD 106 :** la VID augmente et le RD diminue progressivement avec la concentration initiale. Au-delà de  $80 \text{ mg.L}^{-1}$ , la variation de RD varie de 51.54 et 36.14 % pour les concentrations allant de 80 à  $160 \text{ mg.L}^{-1}$ .

2. **Cas du colorant BD 77 :** l'allure de VID est ascendante jusqu'à la concentration de  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  et le RD suit une allure descendante mais cette diminution n'est pas importante.

Les concentrations optimales correspondantes aux maximums de vitesse et de rendement de décoloration sont :  $80$  et  $180 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le JD 106 et BD 77, respectivement.

✓ **Détermination des paramètres cinétiques de décoloration par la C-peroxydase libre**

Le but de cette partie est d'établir un modèle décrivant la variation de la vitesse initiale de transformation enzymatique en fonction de la concentration initiale du colorant. Ce modèle doit refléter les résultats expérimentaux en calculant les paramètres cinétiques tels que : la vitesse maximale et les constantes cinétiques ( $V_M$  et  $K_M$ ).

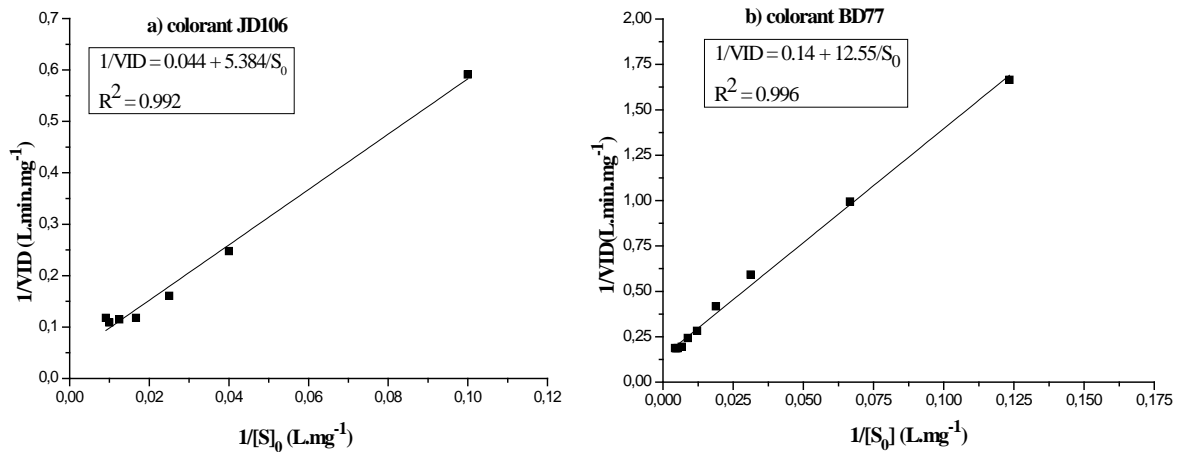
Les allures des courbes de vitesse initiale illustrées par la figure IV.11, décrivent une variation hyperbolique équilatère. L'équation établie par Michaelis et Menten [209] est donnée par la relation IV.1:

$$VID = \frac{V_M \cdot [S_0]}{K_M + [S_0]} \quad (IV.1)$$

La réécriture de cette équation sous forme d'une représentation linéaire permet la détermination des paramètres cinétiques  $K_M$  et  $V_M$ .

$$\frac{1}{VID} = \frac{1}{V_M} + \frac{K_M}{V_M} \cdot \frac{1}{[S_0]} \quad (IV.2)$$

La représentation graphique de Lineweaver et Burk de la variation de  $\frac{1}{VID}$  en fonction de  $\frac{1}{[S_0]}$  des deux colorants est donnée sur les figures IV.13.a et IV.13.b. Les paramètres  $V_M$  et  $K_M$  sont donnés dans le tableau IV.4.



**Figure IV.13.** Graphiques en double inverse de Lineweaver et Burk pour les colorants : (a) JD 106 et (b) BD 77

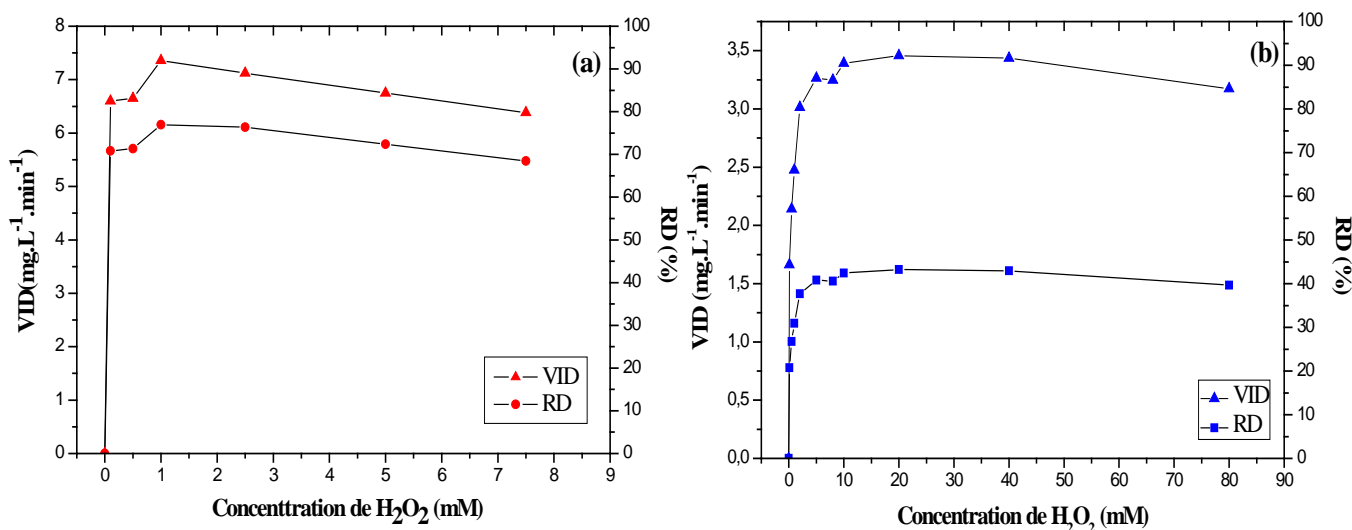
Afin de montrer l'affinité des molécules des colorants vis-à-vis des molécules d'enzyme, il est important de calculer la constante d'affinité définie par l'inverse de la constante de Michaelis-Menten.

**Tableau IV.4.** Paramètres cinétiques des colorants déterminés à partir de l'équation de Lineweaver et Burk.

	<b>JD 106</b>	<b>BD 77</b>
<b><math>V_M</math> (mg.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>	14.66	7.11
<b><math>K_M</math> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	78.87	89.24
<b><math>K_{aff}</math> (L.mol<sup>-1</sup>)</b>	16902.49	4216.94
<b>RD (%) à la concentration optimale du colorant</b>	73.93	42.97

### IV.3.5. Effet de la concentration initiale de $H_2O_2$

Le peroxyde d'hydrogène rentre dans le cycle catalytique de la peroxydase par oxydation de la forme native au niveau de sa partie héminique et la formation des radicaux intermédiaires qui agissent sur les molécules organiques (ici les molécules du colorant) assurant ainsi leur conversion en produits. A cet effet, l'efficacité de décoloration est affectée par la concentration des molécules de peroxyde d'hydrogène. Les différents rendements de décoloration des colorants JD 106 et BD 77 ont été calculés à partir des conditions du tableau III.4 et les résultats sont illustrés sur les figures IV.14 et IV.15.



**Figure IV.14.** Effet de la concentration du  $H_2O_2$  sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b) par la C-peroxydase libre

(Pour le JD 106 :  $[JD\ 106] = 50\ mg.L^{-1}$ ,  $[AE] = 1.4\ UI.ml^{-1}$ , pH 2, durée = 5 min et  $T_{ambiante}$ .  
 Pour le BD 77 :  $[BD\ 77] = 80\ mg.L^{-1}$ ,  $[AE] = 0.8\ UI.ml^{-1}$ , pH 2, durée = 10 min et  $T_{ambiante}$ )

#### ✓ Pour le traitement des colorants avec la C-peroxydase libre

VID et RD augmentent avec la concentration de  $H_2O_2$  jusqu'à 1 mM pour le JD 106 correspondant à  $7.359\ mg.L^{-1}.min^{-1}$  et 76.95 %, respectivement et 10 mM pour le BD 77 correspondant à  $3.4576\ mg.L^{-1}.min^{-1}$  et 43.22 %, respectivement. Au-delà de ces concentrations, la décoloration réduit (inhibition de l'AE par excès de  $H_2O_2$ , en particulier dans le cas du JD 106).

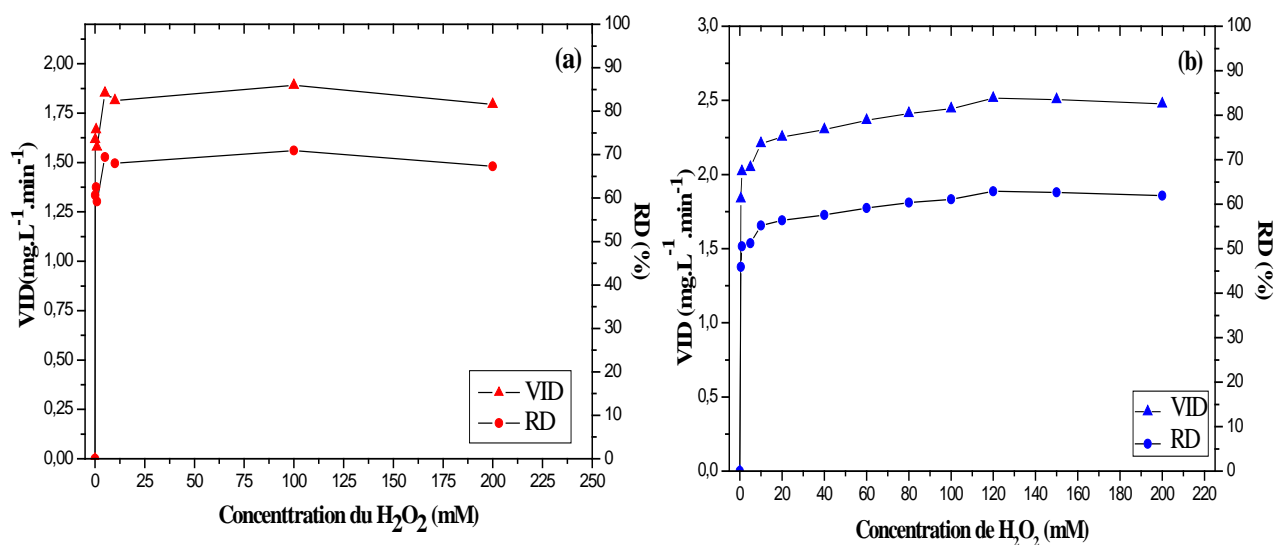
En rapportant quelques études de traitement des polluants organiques par les peroxydases, il est à noter l'importance de déterminer la concentration optimale de  $H_2O_2$  pour une AE maximale vis-à-vis du substrat à traiter. Les travaux réalisés sur l'action de la HRP et l'effet de la peroxydase du chou-fleur sur les colorants azoïques et anthraquinoniques montrent qu'une concentration optimale comprise entre 0.75 et 1 mM permet d'obtenir un

maximum de décoloration [157]. Au-delà de la concentration optimale, un effet d'inhibition a été observé. De même, un effet négatif de la concentration de  $H_2O_2$  est observé dans le cas du traitement du phénol avec la BGP [164].

L'effet inhibiteur de l'excès de  $H_2O_2$  est causé par une forte production des intermédiaires réactionnels qui désactivent la peroxydase [238]. Cette désactivation a été aussi discutée dans les travaux de Duarte-Vazquez et al. (2001) [239] où l'oxydation irréversible du groupe héminique ait lieu pour des concentrations de peroxydase d'hydrogène supérieures à la concentration critique pour une AE donnée.

✓ *Pour le traitement des colorants avec la C-peroxydase immobilisée*

Les figures IV.15 a et IV.15.b montrent, que l'inhibition provoquée par l'excès de  $H_2O_2$  avec la peroxydase libre est très faible. Les concentrations de  $H_2O_2$  pour une décoloration maximale des colorants : JD 106 et BD 77, sont 100 mM et 120 mM, respectivement. L'immobilisation protège donc l'enzyme de l'inactivation provoquée par les fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène.



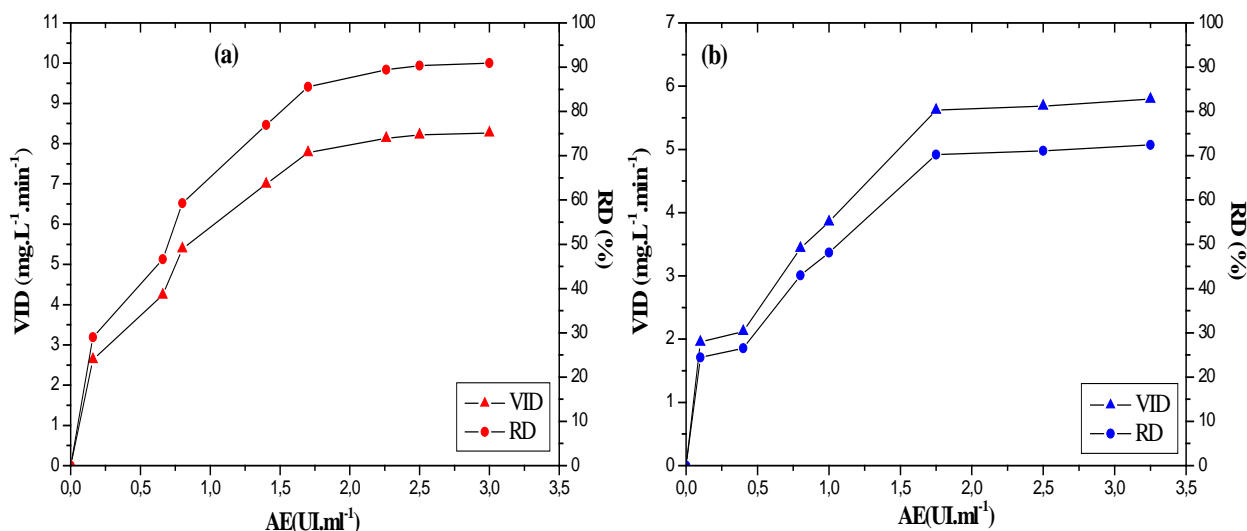
**Figure IV.15.** Effet de la concentration du  $H_2O_2$  sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b) par la C-peroxydase immobilisée

(Pour le JD 106 : [JD 106] = 80 mg.L<sup>-1</sup>, [AE] = 0.258 UI.g<sup>-1</sup>, pH 2, durée = 30 min et  $T_{\text{ambiante}}$ .  
Pour le BD 77 : [BD 77] = 180 mg.L<sup>-1</sup>, [AE] = 0.88 UI.g<sup>-1</sup>, pH 2, durée = 45 min et  $T_{\text{ambiante}}$ )

### IV.3.6. Effet de l'AE de C-peroxydase

La transformation de quantité déterminée de colorant est fortement influencée par la quantité d'enzyme dans le mélange réactionnel. Comme l'enzyme est un catalyseur, il nécessite du temps pour qu'un maximum de décoloration soit atteint, cela dépend aussi de la nature de substrat (affinité enzyme-substrat). Toutefois, afin de montrer l'effet de la

concentration de C-péroxydase sur la réaction de transformation des colorants, il est important de maintenir les concentrations des substrats constantes. Les figures IV.16 et IV.17 présentent la variation de VID et de RD en fonction des AE de C-péroxydases libre et immobilisée, respectivement.



**Figure IV.16.** Effet de l'AE de la peroxydase libre sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b)

(Pour le JD 106 : [JD 106] = 50 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1 mM, pH 2, durée = 5 min et T<sub>ambiante</sub>.)

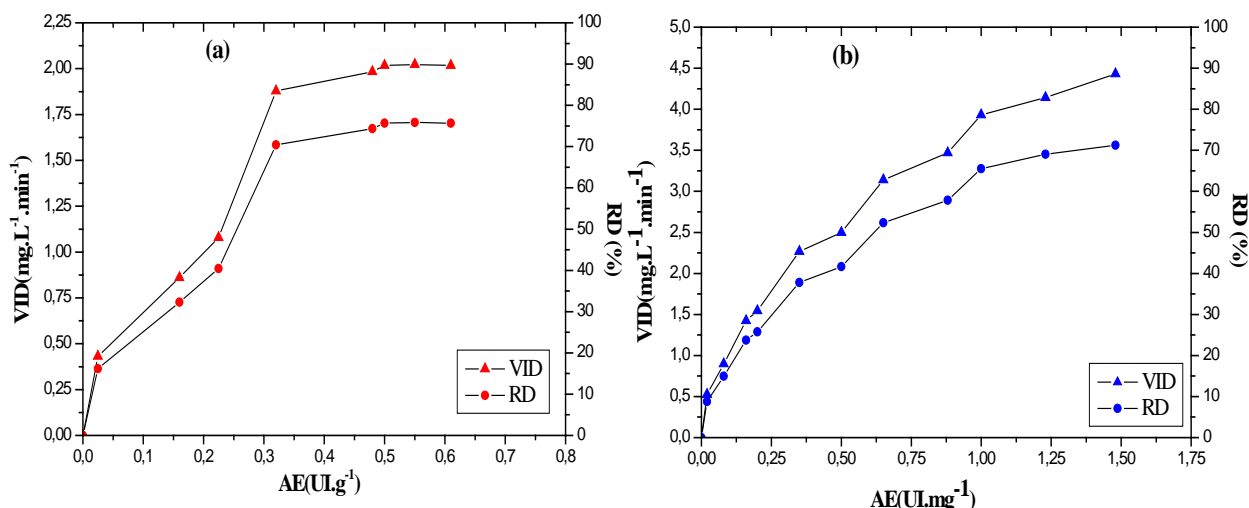
Pour le BD 77 : [BD 77] = 80 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 10 mM, pH 2, durée = 10 min et T<sub>ambiante</sub>.)

#### ✓ Pour le traitement avec la C-péroxydase libre

Une décoloration rapide traduite par une augmentation prononcée du VID est signalée avec l'augmentation de l'AE pour les deux colorants. Cependant, à faible AE (0.16 UI.ml<sup>-1</sup>) pour le JD 106 et 0.1 UI.ml<sup>-1</sup> pour le BD 77 plus de 29 et 24 % de décoloration sont atteints avec des VID de 2.63 et 1.95 mg.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, respectivement. Aux AE de 2.25 et 1.75 UI.ml<sup>-1</sup> un maximum de décoloration est atteint : 89.45 et 70.26 % de RD avec VID de : 8.13 et 5.62 mg.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> pour le JD 106 et BD 77, respectivement. Au-delà de ces doses d'enzyme, une légère variation des paramètres de décoloration est détectée. Des résultats similaires ont été obtenus dans les travaux de Mohan et al. (2005) [145].

#### ✓ Pour le traitement avec la C-péroxydase immobilisée

VID et RD du JD 106 croissent avec l'augmentation de l'AE de la C-péroxydase immobilisée pour atteindre un maximum à AE de 0.5 UI.g<sup>-1</sup> correspondant à RD de 75.66 % et à VID de 2.02 mg.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Au-delà de cette AE, la VID tend vers une valeur maximale.



**Figure IV.17.** Effet de l'AE de la peroxydase immobilisée sur la décoloration de JD 106 (a) et BD 77 (b)

(Pour le JD 106 : [JD 106] = 80 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.1 M, pH 2, durée = 30 min et T<sub>ambiante</sub>.  
 Pour le BD 77 : [BD 77] = 180 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.12 M, pH 2, durée = 45 min et T<sub>ambiante</sub>)

En ce qui concerne le colorant BD 77, l'augmentation de RD et de VID a lieu pour toutes les valeurs d'AE étudiées (0.02 à 1.48 UL.g<sup>-1</sup>). A la dose élevée de l'enzyme, RD et VID atteignent des valeurs de 73.84% et 4.43 mg.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, respectivement.

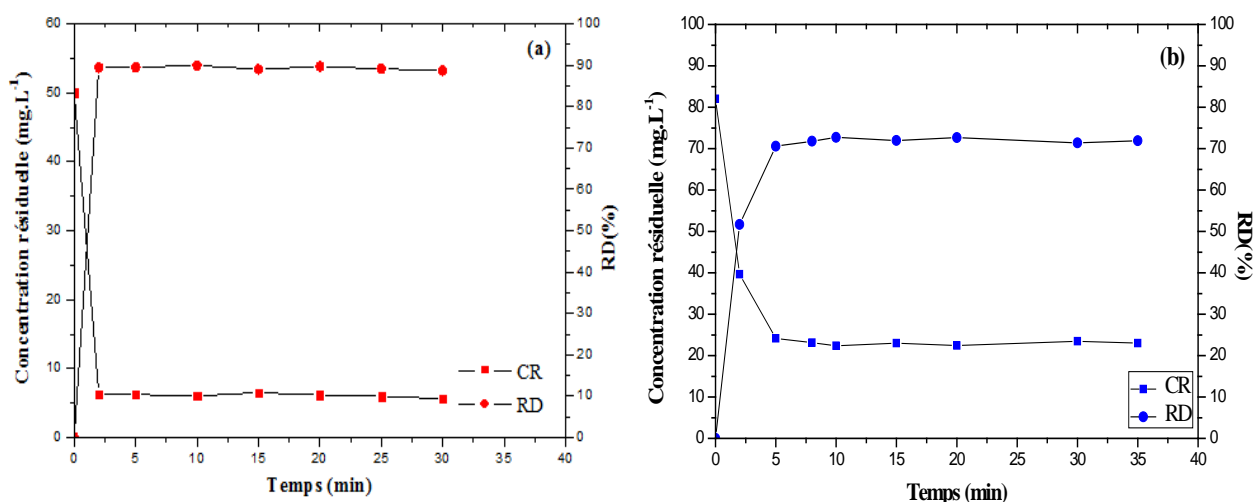
En comparant les valeurs de VID obtenues par les deux formes de peroxydase, l'immobilisation réduit la vitesse de décoloration enzymatique. Ce résultat confirme les phénomènes de diffusion de substrats au sein de micro-environnement de l'enzyme immobilisée dans le polymère d'alginate. Des constatations identiques ont été observées par plusieurs auteurs pour des peroxydases extraites de différentes sources végétales et pour des substrats variés [173, 179, 236].

#### IV.3.7. Temps de contact optimal

Aux conditions optimales rassemblées dans le tableau IV.5, les cinétiques de décoloration des deux colorants sur les deux formes de C-peroxydase (libre : figure IV.18 et immobilisée : figure IV.19), montrent une amélioration très significative du temps de contact (substrat-enzyme). Des durées de 2 min (pour JD 106) et de 10 min (pour BD 77) du traitement par la peroxydase libre et 15 et 20 min pour les deux colorants sur la peroxydase immobilisée ont été obtenues.

**Tableau IV.5.** Récapitulation des valeurs optimales des paramètres pour le traitement de JD 106 et de BD 77 par la C-peroxydase libre et immobilisée

	Forme libre		Forme immobilisée	
	JD 106	BD 77	JD 106	BD 77
<b>pH</b>	2	2	2	2
<b>Concentration de colorant (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	50	80	80	180
<b>Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mM)</b>	1	10	100	120
<b>AE (UI.ml<sup>-1</sup>)</b>	2.25	1.75		
<b>AE (UI.g<sup>-1</sup>)</b>			0.5	1.48
<b>RD(%)</b>	89.45	70.26	75.66	71.14

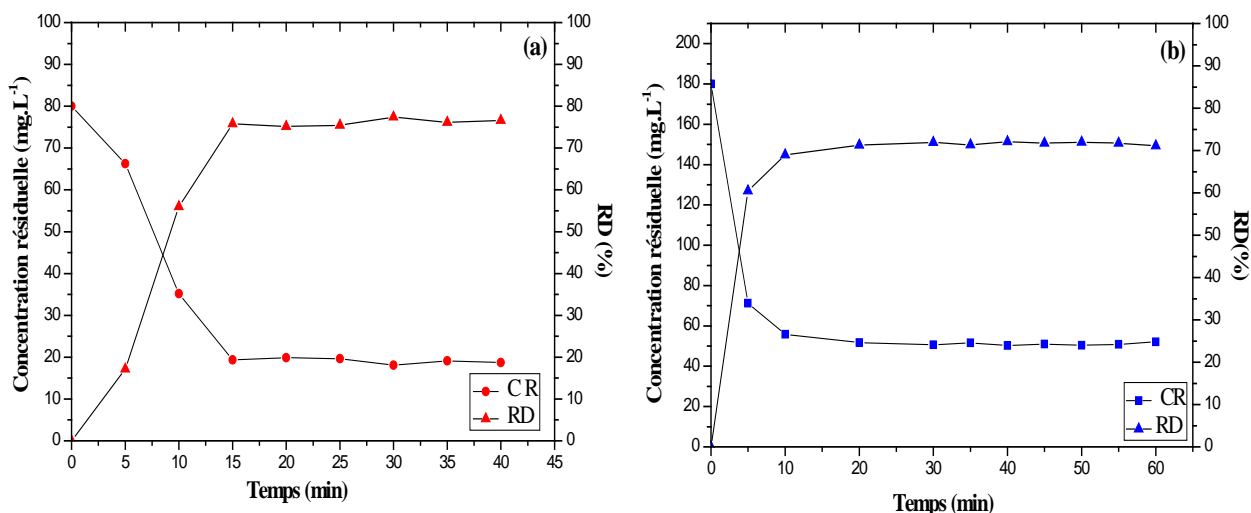
**Figure IV.18.** Cinétiques de décoloration par la C-peroxydase libre de (a) JD 106

et (b) BD 77 (Pour le JD 106 : [JD 106] = 50 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1 mM, [AE] = 2.25 UI.ml<sup>-1</sup>, pH 2, durée = 5 min et T<sub>ambiante</sub>.)

Pour le BD 77 : [BD 77] = 80 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 10 mM, [AE] = 1.75 UI.ml<sup>-1</sup>, pH 2, durée = 10 min et T<sub>ambiante</sub>.)

Le temps des réactions enzymatiques vis-à-vis les colorants étudiés a été réduit pour les deux formes de l'enzyme. Néanmoins, ce temps varie d'un colorant à l'autre. Selon de Souza et al. (2007) [128], le temps de la réaction est directement lié à la structure de la molécule du substrat, ce qui influe par conséquent sur l'activité enzymatique.

Cependant, les concentrations résiduelles des colorants traités après action enzymatique correspondent aux valeurs de 6.27 et 19.37 mg.L<sup>-1</sup> pour le JD 106 traité par la peroxydase libre et immobilisée, respectivement. Tandis que des concentrations de BD 77 sont de 22.39 et 48.63 mg.L<sup>-1</sup> de BD 77 après traitement par la peroxydase libre et immobilisée, respectivement.



**Figure IV.19.** Cinétiques de décoloration par la C-peroxydase immobilisée de (a) JD 106 et (b) BD 77. (Pour le JD 106 : [JD 106] = 80 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.1 M, [AE] = 0.5 UI.g<sup>-1</sup>, pH 2, et T<sub>ambiante</sub>. Pour le BD 77 : [BD 77] = 180 mg.L<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.12 M, [AE] = 1.48 UI.g<sup>-1</sup> pH 2, et T<sub>ambiante</sub>)

#### IV.3.8. Effecteurs chimiques

Afin de montrer l'effet de quelques cations métalliques sur la vitesse de décoloration des molécules de JD 106 et BD 77 aux concentrations optimales, le tableau IV.6, montre les résultats correspondants.

**Tableau IV.6.** TA et TI de quelques effecteurs chimiques de la C-peroxydase libre vis-à-vis le JD 106 et le BD 77 (durée de réaction 2 min et 10 min pour JD 106 et BD 77 respectivement, T<sub>ambiante</sub>)

Effecteur	Concentration (mM)	JD 106		BD 77	
		Inhibiteur ou activateur	TA ou TI (%)	Inhibiteur ou Activateur	TA ou TI (%)
Chlorure de plomb	1	Activateur	6.6	Inhibiteur	3.88
Sulfate de fer	10	Activateur	6.1	Activateur	4.05
Chlorure de Calcium	20	Activateur	2.8	Activateur	1.93
AlCl <sub>3</sub>	10	Activateur	1.42	Activateur	7.52
Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2	Inhibiteur	2.38	Inhibiteur	3.11

Le cation  $\text{Cr}^{3+}$  est un inhibiteur des deux colorants tandis que le  $\text{Pb}^{2+}$  est un inhibiteur en présence de BD 77. Par contre tous les autres cations métalliques ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Al}^{3+}$ ) sont des activateurs de la peroxydase en présence des deux colorants avec des taux allant de 1.42 à 7.52%.

L'activation des peroxydases par les cations bivalents et trivalents a été démontrée dans la bibliographie [9].

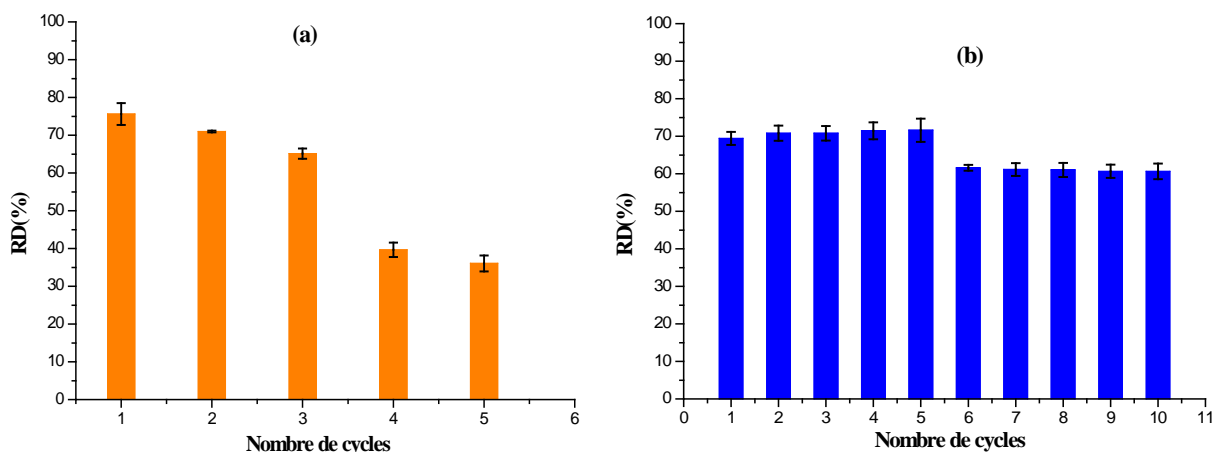
### IV.3.9. Utilisation des batch successifs

L'avantage de l'immobilisation est la réutilisation de l'enzyme plusieurs fois dans les mêmes conditions optimales (tableau IV.5). Il est donc nécessaire de contrôler la stabilité et son pouvoir catalytique (AE) pour les colorants étudiés.

La figure IV.20 illustre les cycles de réutilisation des billes d'alginate chargées de C-peroxydase vis-à-vis les deux colorants.

#### 1. Cas du colorant JD 106

La C-peroxydase retient 87 % d'AE après les trois premières utilisations, ensuite, elle diminue à la valeur de 37 % après la cinquième utilisation. Cela peut être dû à la présence de métabolites réactionnels qui bloquent les pores du support et les rendent inaccessibles pour la réalisation d'autres cycles réactionnels.



**Figure IV.20.** Variation de RD avec le nombre de fois lors de l'utilisation de billes de C-peroxydase, (a) : JD 106 et (b) : BD 77

(Pour le JD 106 :  $[\text{JD 106}] = 80 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.1 \text{ M}$ ,  $[\text{AE}] = 0.5 \text{ UI.g}^{-1}$ , pH 2, durée = 15 min et

$T_{\text{ambiante}}$   
 Pour le BD 77 :  $[\text{BD 77}] = 180 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.12 \text{ M}$ ,  $[\text{AE}] = 1.48 \text{ UI.g}^{-1}$  pH 2, durée = 20 min et  $T_{\text{ambiante}}$ )

## 2. Cas du colorant BD 77

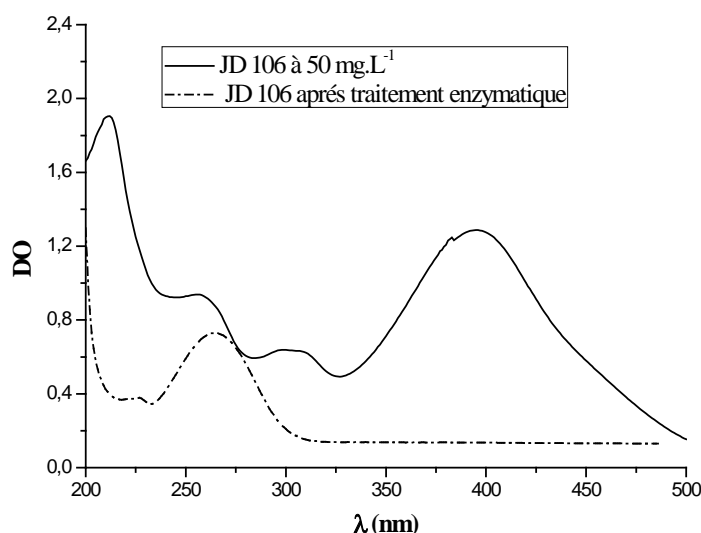
La C-peroxydase préserve son activité jusqu'au cinquième cycle. A partir du sixième et au dixième cycles, RD diminue légèrement (11%). Des investigations similaires ont été observées. En effet, un taux de 59 % d'AE de BGP a été retenu jusqu'au huitième cycle [155].

Dans les travaux de Guerrero et al. (2008) [180], un rendement de transformation du phénol de 90% est détecté pendant les dix premiers cycles avec la peroxydase de navet immobilisée dans les billes d'alginate de calcium.

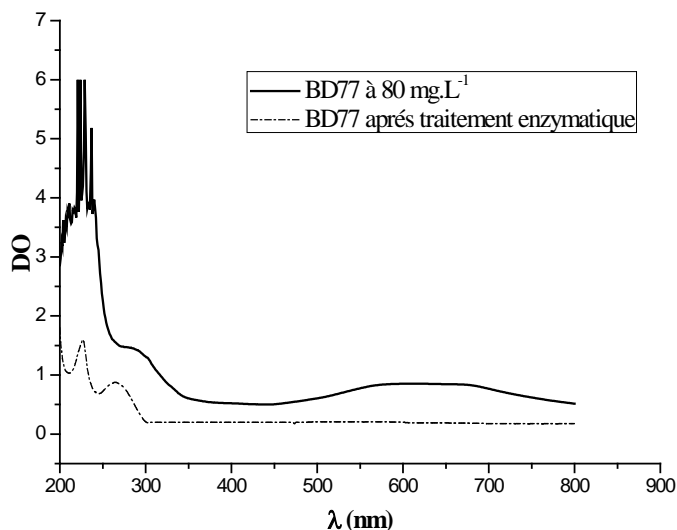
### IV.3.10. Caractérisation spectrale des surnageants et des précipités obtenus

#### A. Analyse des surnageants par spectrophotomètre UV-visible

A la lumière des résultats obtenus en terme de RD, les solutions de colorants (JD 106 et BD 77) traitées par la C-peroxydase libre aux conditions optimales ont été analysées par spectrophotométrie UV-visible en balayant la longueur d'onde de 200 à 500 nm pour le JD 106 et de 200 nm à 800 nm pour le BD 77. Cette analyse des solutions de colorants et des solutions à la fin du traitement enzymatique a donné des résultats présentés dans les figures IV.21 et IV.22. (Les photos des surnageants et des précipités obtenus après le traitement enzymatique des deux colorants sont présentés en annexe 7).



**Figure IV.21.** Spectres UV-visible de la solution initiale (50 mg.L<sup>-1</sup>) de JD 106 et du surnageant après traitement enzymatique sous conditions optimales



**Figure IV.22.** Spectres UV-visible de la solution initiale ( $80 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de BD 77 et du surnageant après traitement enzymatique sous conditions optimales

A propos des spectres établis, l'analyse permet de comparer qualitativement l'efficacité du procédé enzymatique avec peroxydase libre.

### 1. Cas du traitement du colorant JD106

Le spectre de la solution avant traitement présente quatre bandes d'absorption caractéristiques (figure IV.21) : trois dans la région de l'UV (à  $\lambda = 212, 256$  et  $298 \text{ nm}$ ) et l'autre dans le visible (à  $\lambda = 396 \text{ nm}$ ). Celles de la région de l'UV, sont caractéristiques des cycles aromatiques (transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ ), tandis que celle de la région du visible est caractéristique du groupement chromophore caractéristique des colorants azoïques (transition  $n \rightarrow \pi^*$  du  $-\bar{N} = \bar{N} -$ ) [240, 241]. Il est clair que ce dernier pic a disparu complètement après le traitement enzymatique. Cela montre, que sous les conditions optimales, le groupement chromophore du colorant est transformé par la C-peroxydase.

Dans la zone UV, il y a aussi disparitions des bandes d'absorption avec apparition d'un nouveau pic à  $265 \text{ nm}$  dans le spectre du surnageant. Cela est probablement dû à la formation des produits intermédiaires de transformation des molécules azoïques par action de la peroxydase telles que les amines aromatique et autres molécules aromatiques comportant la fonction stilbène [11, 12, 147].

### 2. Cas du traitement du colorant BD 77

Le spectre de la solution initiale de BD 77 présente une large bande d'absorption dans la région du visible avec un maximum à  $609 \text{ nm}$ , qui correspond à la transition  $n \rightarrow \pi^*$  et  $\pi \rightarrow \pi^*$  du groupement chromophore des groupements :  $=C=O$  et  $-C=C-$  caractéristiques des

colorants anthraquinoniques. La seconde bande d'absorption entre 200 et 250 nm est intense, elle correspond aux transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  des cycles aromatiques du BD 77.

Sur le spectre du surnageant, une réduction remarquable dans la bande d'absorption de la zone du visible de 70%. Cependant, les bandes d'absorption dans la région UV (aux longueurs d'ondes de 225 et 265 nm) correspondent aux composés aromatiques existant dans le mélange final. Certaines études rapportent que l'oxydation des colorants anthraquinoniques par la peroxydase, produisent des composés aromatiques mononucléaires comportant dans certains cas des fonctions alcools et/ou acides [60, 61].

### **B. Analyse des précipités par spectroscopie IRTF**

La majorité des réactions catalysées par la peroxydase d'origine végétale conduisent à la formation des radicaux libres suivie de leur polymérisation [60, 150].

A la fin du traitement enzymatique des colorants par la C-peroxydase, des précipités générés par des composés aromatiques ont été récupéré puis analysés par IRTF. Les spectres correspondant sont illustrés sur les figures IV.23 et IV.24. (Les spectres IR des colorants sont donnés dans l'annexe 4).

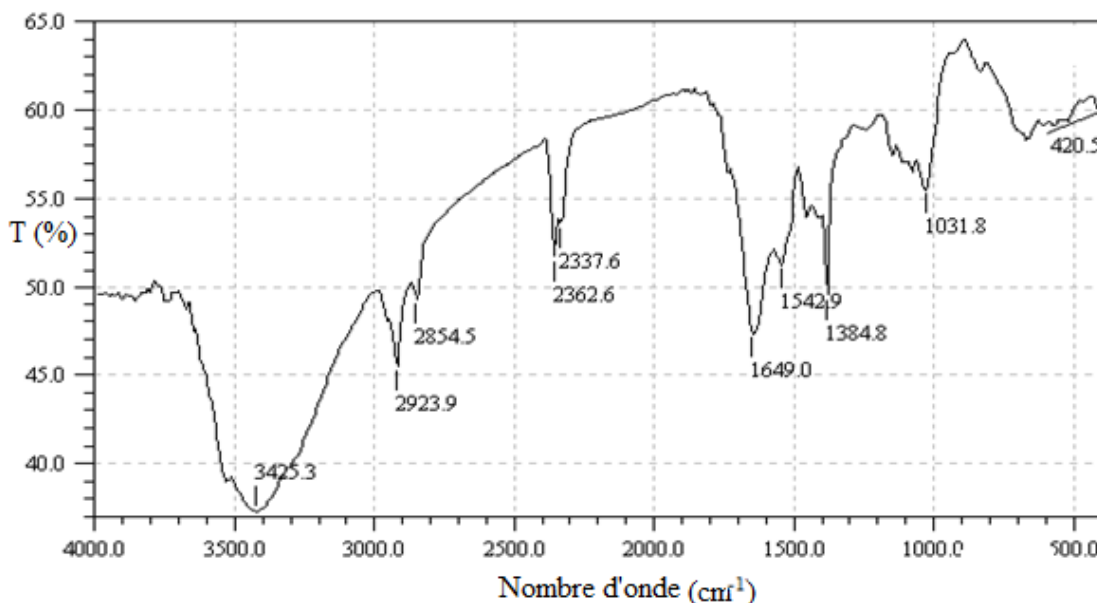
#### **1. Cas du colorant JD 106**

L'analyse des spectres se fait par intervalles :

- Entre 500 et 1500  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la zone contenant l'empreinte digitale, elle contient plus de pics dans le cas du colorant que celle de son précipité.

Les principaux pics correspondant aux pics aux 1045.3 et 879  $\text{cm}^{-1}$  des vibrations de déformation des C-H des cycles aromatiques et celui à 786  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la déformation =C-H des aromatiques trisubstitués. La présence des vibrations aux nombres d'onde de 1199.6 et 1110.9  $\text{cm}^{-1}$  concernent l'élongation de C-N et les pics aux 1546.8, 1492.8 et 1431.1  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations -C=C- des cycles aromatiques. Ainsi la vibration de déformation hors plan de H-C=C-H en position trans se situe au pic d'absorption de 1045.3  $\text{cm}^{-1}$  [242].

- Entre 1500 et 3500  $\text{cm}^{-1}$ , le pic à 1589.2  $\text{cm}^{-1}$  est caractéristique de la vibration de déformation  $-\text{N}=\text{N}-$  et l'absorption à 2923.9  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la vibration d'élongation de C-H. Ainsi, la vibration d'élongation  $-\text{C}=\text{C}-$  du cycle aromatique est au nombre d'onde : 1546.8  $\text{cm}^{-1}$ . En outre, l'élongation à 1326.9  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la liaison S=O du groupement sulfonique et celle de  $-\text{C}-\text{S}$  se situe à 617  $\text{cm}^{-1}$ . Toutes ces absorptions confirment la structure azoïque sulfonique du JD 106 [242].



**Figure IV.23.** Spectre IR du précipité du JD 106 récupéré après traitement enzymatique sous conditions optimales

### 2. Cas du précipité du JD 106

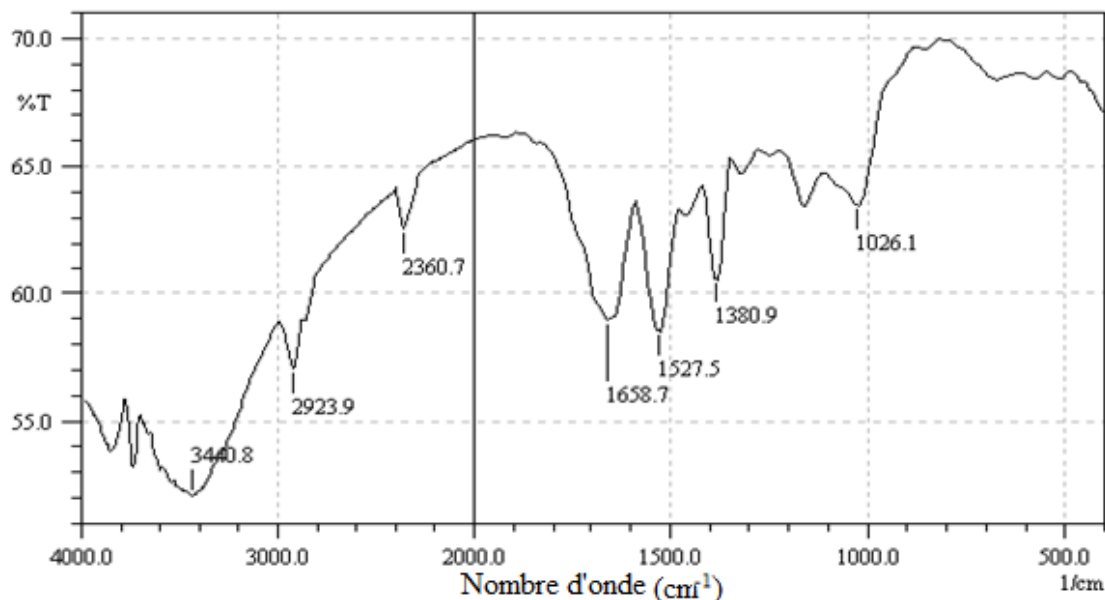
L'apparition et la disparition des bandes d'absorption est remarquable dans le spectre de la figure IV.23.

- Disparition du pic correspondant au groupement  $-\text{N}=\text{N}-$  et apparition d'un pic à 1649  $\text{cm}^{-1}$  : c'est la déformation  $-\text{N}-\text{H}$  des amides.
- Apparition des pics 2362.6, 2337.6 et 1031.8  $\text{cm}^{-1}$ , ce dernier correspond à la vibration de déformation hors plan de  $\text{H}-\text{C}=\text{C}-\text{H}$  en position trans.

### 3. Cas du colorant BD 77

- Dans la zone 500-1500, un pic à 820  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la déformation  $=\text{C}-\text{H}$  des aromatiques disubstitués. La présence d'une vibration au nombre d'onde de 1114.8  $\text{cm}^{-1}$  correspond à d'élongations de C-N. Le pic au nombre d'onde à 1380.9  $\text{cm}^{-1}$  est celui de la déformation O-H.

- Dans la zone 1500-3500  $\text{cm}^{-1}$ , les pics aux 1515.9 et 1465.8  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations -C=C- des cycles aromatiques. Tandis que le pic à 1616.2  $\text{cm}^{-1}$  est celui de -N-H. L'absorption caractéristique du quinone C=O se localise à 1698.4  $\text{cm}^{-1}$  [242].



**Figure IV.24.** Spectre IR du précipité du BD 77 récupéré après traitement enzymatique sous conditions optimales

#### 4. Cas du précipité BD77

Il y a déplacement de la vibration C=O vers 1658.7  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique des C=O des acides carboxyliques aromatiques. Le pic à 1527.5  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la vibration C=C des cycles aromatiques. Le même pic apparaît au nombre d'onde de 1380.9  $\text{cm}^{-1}$  (déformation O-H) [242]. La C-peroxydase a agit sur les groupements chromophores des colorants azoïque et anthraquinonique, cela a été traduit par la disparition des pics de vibrations caractéristiques des colorants.

#### IV.3.11. Conclusion

Les résultats de cette étude ont montré, que les molécules de JD 106 et de BD 77 sont transformées par la C-peroxydase sous forme libre et immobilisée dans la matrice d'alginate de calcium. Les résultats de l'optimisation du pH, des concentrations de colorant, de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de l'enzyme ont montré qu'un rendement de décoloration de plus de 89% et de 70% pour le JD 106 et le BD 77, respectivement ont été obtenus.

La réutilisation de l'enzyme avec un nombre de cycle plus important a été obtenue pour le colorant BD77 que pour le colorant JD 106 dans les conditions opératoires optimales.

A partir des courbes cinétiques de décoloration, des concentrations de BD 77 de 22.39 mg.L<sup>-1</sup> et 48.63 mg.L<sup>-1</sup> n'ont pas été transformées à la fin de la réaction enzymatique par la peroxydase libre et immobilisée, respectivement. Tandis que celles du JD 106, elles étaient de 6.27 et 19.37 mg.L<sup>-1</sup> après traitement par la peroxydase libre et immobilisée, respectivement. Face à ces résultats, nous tentons d'appliquer le traitement Fenton.

#### IV.4. Etude de décoloration chimique par le procédé Fenton

Récemment, plusieurs études ont déjà montré que le procédé Fenton était relativement efficace pour dégrader certains colorants textiles. Cette efficacité réside à considérer cette méthode parmi les techniques rapides, onéreuses et très adaptées aux composés organiques réfractaires et/ou toxiques [13].

Dans cette partie, nous avons cherché les conditions permettant l'oxydation des colorants dans le but d'améliorer le rendement de décoloration. Cette méthode met en réaction les cations ferreux et le peroxyde d'hydrogène en milieu acide pour produire des radicaux hydroxyle : agents oxydants puissants.

En premier lieu, une optimisation des paramètres : pH, concentrations des réactifs Fenton ( $\text{Fe}^{+2}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et des colorants a été effectuée.

En second lieu, la cinétique d'oxydation de chaque colorant, dans les conditions optimales a été identifiée.

##### IV.4.1. Effet du pH

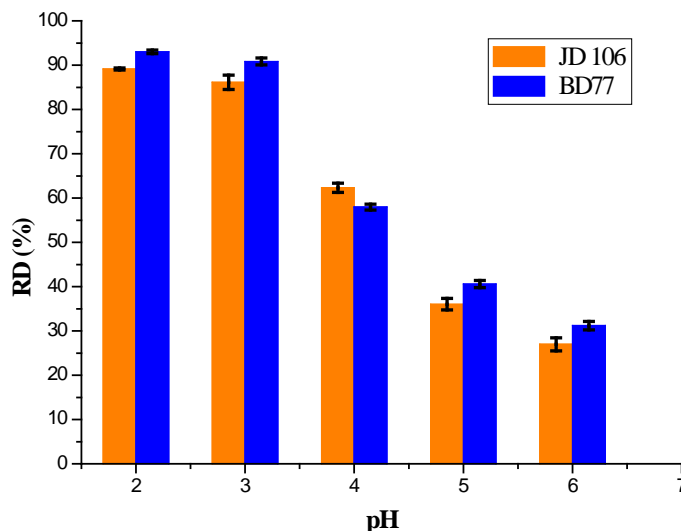
Le pH du milieu réactionnel dans le procédé Fenton est un paramètre important pour l'efficacité du procédé. Il affecte directement le mécanisme d'oxydation de la molécule organique. Cet effet se traduit par la génération des radicaux hydroxyle et par le contrôle des ions ferreux, ce qui influe fortement l'efficacité de l'oxydation [13].

La variation du RD des deux colorants en fonction du pH est illustrée sur la figure IV.25. Selon cette figure, il est clair que le maximum de décoloration s'effectue à un pH acide égale à 2 : 89.13 et 93.02 % de RD pour JD 106 et BD 77, respectivement. A pH 3, il diminue de 3 % seulement.

La quantité des radicaux hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ) produite selon la réaction IV.12 est importante au pH optimal à cause de la forte régénération des molécules de peroxyde d'hydrogène. Ainsi, l'équilibre de solubilité est contrôlé par les ions ferreux et l'hydroxyde ferrique [13].



Lorsque le pH augmente ( $\text{pH} > 3$ ), RD diminue pour atteindre 26.96 % et 31.2 % à pH 6 : pour les colorants JD 106 et BD 77, respectivement.



**Figure IV.25.** Effet du pH sur le RD par procédé Fenton, (a) : JD 106 et (b) : BD 77. ( $[\text{colorant}] = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8 \text{ mM}$  et  $[\text{Fe}^{2+}] = 1 \text{ mM}$  pour le JD 106;  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mM}$  et  $[\text{Fe}^{2+}] = 2 \text{ mM}$  pour le BD 77 et temps de réaction = 20min)

Cependant, à pH supérieur à 4, RD diminue d'une manière significative. Cela est dû d'une part, à la précipitation des cations ferreux par les ions hydroxyle en formant le complexe  $(\text{Fe}(\text{OH})_3)$  et l'équilibre est contrôlé seulement par l'hydroxyde ferrique, ce dernier réduit le taux de décomposition peroxyde d'hydrogène [13].

Pour des valeurs de pH plus élevées ( $\text{pH} > 5$ ), l'efficacité de la méthode Fenton se réduit encore significativement. Le peroxyde devient instable en solution et se décompose rapidement en oxygène moléculaire. Par conséquent, la formation des radicaux hydroxyle est diminuée.

Plusieurs études rapportent que le pH influe d'une manière dramatique dans la transformation des colorants synthétiques en solution aqueuse, et la valeur optimale est comprise dans l'intervalle 2 à 4 [13, 243, 244].

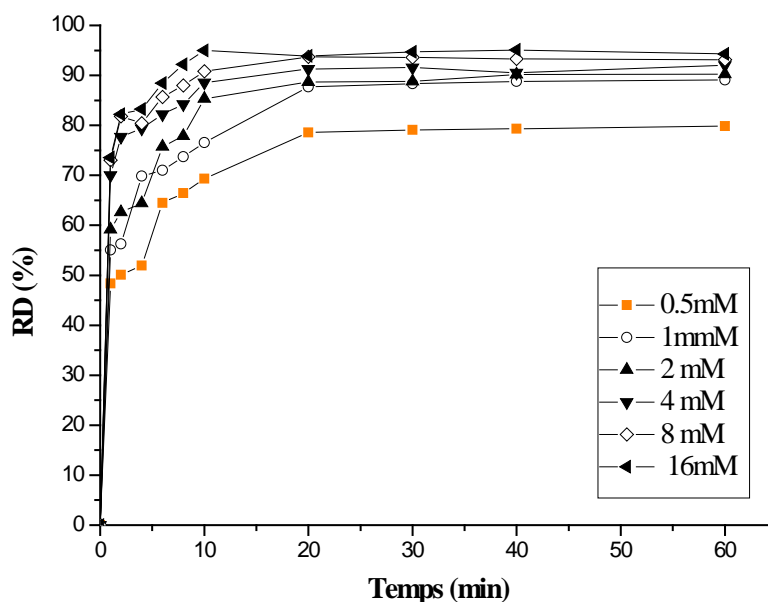
#### *IV.4.2.Effet de la concentration initiale de $\text{H}_2\text{O}_2$*

La sélection de la concentration optimale de peroxyde d'hydrogène responsable de la transformation des colorants par la réaction Fenton est importante de point de vue pratique (due au prix élevé de réactif) [245]. Les résultats présentés sur les figures IV.26 et IV.27 indiquent que RD augmente quand la concentration du  $\text{H}_2\text{O}_2$  augmente dans l'intervalle de 0.5 à 16 mM pour JD 106 et de 1 à 5 mM pour BD 77.

Les maximums de décoloration sont de 93.69 et 96.13 % aux concentrations des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 8 et de 5 mM pour le JD 106 et le BD 77, respectivement.

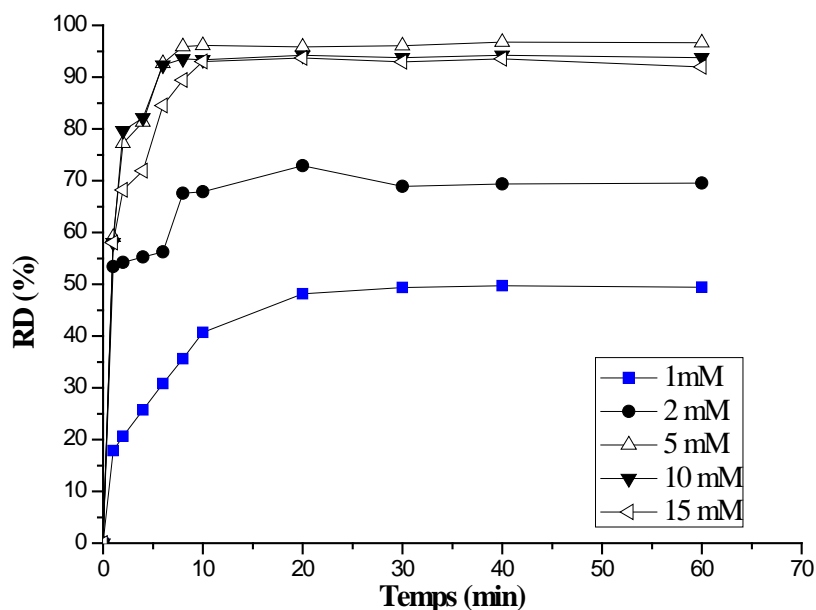
Cette dépendance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la décoloration est due à la forte concentration des radicaux hydroxyle suite à la décomposition des molécules de peroxyde d'hydrogène. Ce qui favorise la transformation des molécules des colorants.

Cependant, l'augmentation de la concentration de peroxyde d'hydrogène dans le mélange réactionnel du BD 77 de 10 à 15 mM réduit RD, ce qui peut être interprété par le piégeage des radicaux hydroxyle (réactions IV.13 et IV.14) dû à l'excès de peroxyde d'hydrogène en formant des radicaux hydroperoxyde (HO<sup>•</sup><sub>2</sub>) [246] :



**Figure IV.26.** Effet de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur le RD de JD 106 par le procédé Fenton, (pH 2, [Fe<sup>2+</sup>]= 1 mM, [colorant] = 50 mg.L<sup>-1</sup> et T<sub>ambiante</sub>)

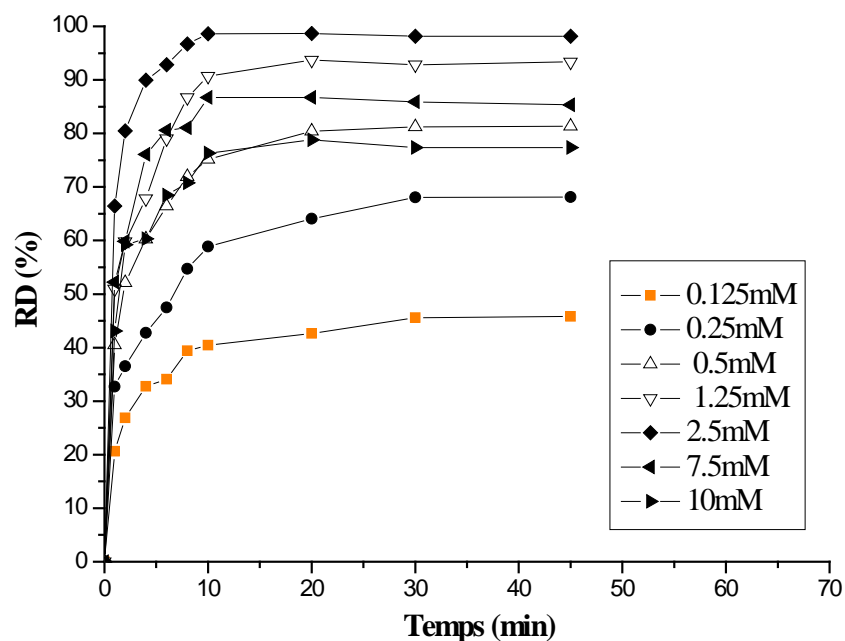
Des concentrations optimales de peroxyde d'hydrogène ont été publiées dans la littérature comprises entre 0.24 et 14.7 mM [246-248].



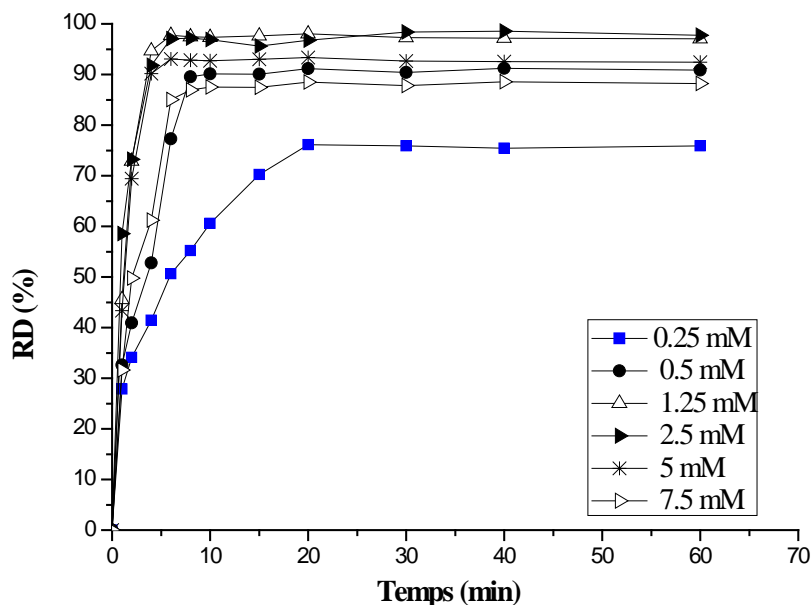
**Figure IV.27.** Effet de la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sur le RD de BD 77 par le procédé Fenton ( $\text{pH } 2$ ,  $[\text{Fe}^{2+}] = 2 \text{ mM}$ ,  $[\text{colorant}] = 50 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $T_{\text{ambiante}}$ )

#### VI.4.3. Effet de la concentration initiale de $\text{Fe}^{2+}$

Le fer sous ses formes ferreux et ferrique agit comme catalyseur dans la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène en générant les radicaux hydroxyle [248]. Les figures IV.28 et IV.29 illustrent l'effet des cations ferreux sur la décoloration des colorants JD 106 et BD 77.



**Figure IV.28.** Effet de la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  sur le RD de JD 106 par le procédé Fenton ( $\text{pH } 2$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8 \text{ mM}$ ,  $[\text{JD } 106] = 50 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $T_{\text{ambiante}}$ )



**Figure IV.29.** Effet de la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  sur le RD de BD 77 par le procédé Fenton ( $\text{pH } 2$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \text{ mM}$ ,  $[\text{BD } 77] = 50 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $T_{\text{ambiante}}$ )

Les résultats obtenus indiquent que l'oxydation des deux colorants dépend fortement de la concentration initiale des ions  $\text{Fe}^{2+}$  (pour des concentrations fixes de peroxyde d'hydrogène et de colorant). L'augmentation de cette dernière améliore la décoloration d'une manière importante.

Aux faibles concentrations (0.125 mM pour le JD 106 et 0.25 mM pour le BD 77), les RD atteignent 45.6 et 76.11% après 30 et 20 min pour JD 106 et BD 77, respectivement. Ainsi, plus la concentration initiale de  $\text{Fe}^{2+}$  dans le milieu réactionnel augmente, plus RD augmente pour atteindre 98.64 % avec 2.5 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  et 97.73% avec 1.25 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  après 10 et 6 min pour le JD 106 et le BD 77, respectivement. Les radicaux hydroxyle sont produits plus rapidement dans le milieu réactionnel à cause de l'augmentation de la concentration du catalyseur selon la réaction IV.12 [246].

L'effet de catalyse des ions ferreux est clair, car, des temps de décoloration plus courts sont atteints pour des concentrations de  $\text{Fe}^{2+}$  inférieures aux concentrations optimales qui correspondent à 10 et 6 min pour le JD 106 et le BD 77, respectivement.

Néanmoins, un excès de  $\text{Fe}^{2+}$  provoque une diminution remarquable de RD pour les deux colorants, cela est dû probablement au piégeage des  $\text{HO}^\bullet$  par ces cations ferreux (réaction IV.15) ce qui réduit l'oxydation et la vitesse d'oxydation des molécules du colorant [13].



Des constatations similaires ont été observées lors des travaux antérieurs sur les colorants azoïques et anthraquinoniques. Ces études rapportent des concentrations optimales allant de 0.025 à 10 mM après des temps de réaction variables entre 5 et 30 min [196, 246].

#### IV.4.4. Effet de la concentration initiale du colorant

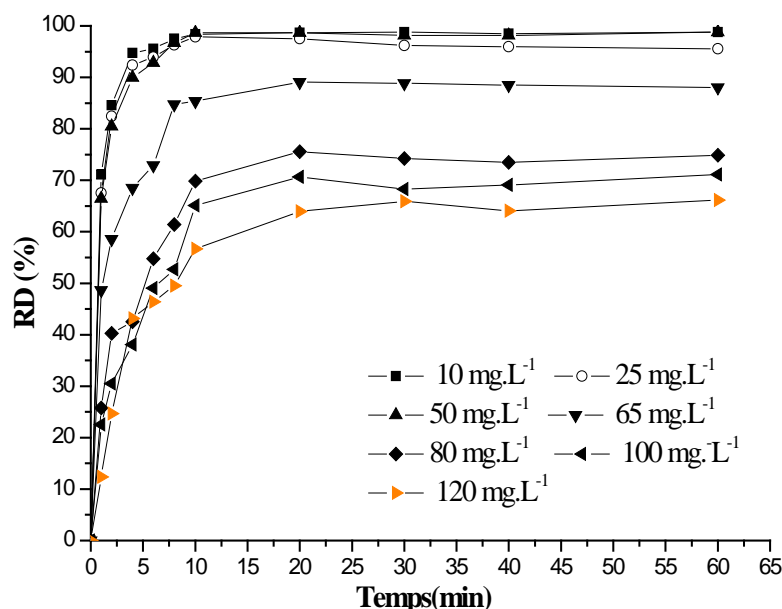
La concentration initiale du colorant est un paramètre important dans les applications pratiques de traitement des effluents. A partir des figures IV.30 et IV.31, la dépendance RD avec la concentration initiale des colorants a été élucidée. Cette dépendance est inversement proportionnelle.

Une décoloration presque totale a été obtenue au bout de 10 min avec les deux colorants dans l'intervalle de concentration allant de 10 à 50 mg.L<sup>-1</sup>.

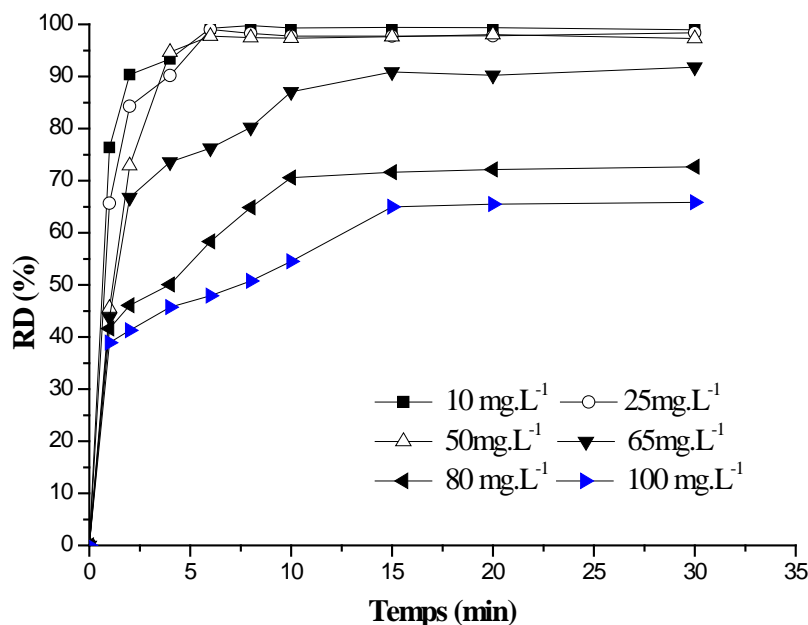
A une concentration initiale de 50 mg.L<sup>-1</sup>, RD des colorants sont 98.66 et 97.73% pour le JD 106 et le BD 77, respectivement.

Aux concentrations supérieures à 50 mg.L<sup>-1</sup>, RD diminue significativement. Cela est dû à l'augmentation de nombre de molécules de colorant pour une teneur fixe des radicaux hydroxyle.

Des études antérieures ont prouvé qu'avec des concentrations comprises entre 20 et 100 mg.L<sup>-1</sup>, la décoloration est maximale [196, 246-249].



**Figure IV.30.** Effet de la concentration initiale du JD 106 sur le RD par le procédé Fenton (pH 2, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 8 mM, [Fe<sup>2+</sup>] = 2.5 mM et T<sub>ambiante</sub>)



**Figure IV.31.** Effet de la concentration initiale du BD 77 sur le RD par le procédé Fenton (pH 2,  $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$ ,  $[Fe^{2+}] = 1.25 \text{ mM}$  et  $T_{\text{ambiante}}$ )

#### VI.4.5. Modèle cinétique de décoloration de JD 106 et de BD 77

L'étude cinétique est un paramètre important pour l'oxydation par le procédé Fenton. Cependant, il n'est pas facile de la mettre en détail parce que plusieurs réactions interviennent simultanément dans ce procédé [250]. Sur le plan cinétique, la vitesse de réaction du radical hydroxyle sur les composés organiques obéit à une loi cinétique d'ordre 1 ou d'ordre 2 [193, 194].

Dans notre étude, et pour un pH optimal et des concentrations optimales de catalyseur et de peroxyde d'hydrogène, les régressions linéaires basées sur les cinétiques de réactions de décoloration des deux colorants du premier et du second ordre sont présentés sur les figures 8.1 à 8.4 de l'annexe 8. Les constantes cinétiques et les coefficients de corrélation sont donnés dans les tableaux IV.7 et IV.8.

A partir de ces résultats, les coefficients de corrélation pour les modèles cinétiques sont compris entre 0.261 et 0.737 pour les différentes concentrations des colorants, d'où ces modèles ne reflètent pas la cinétique de décoloration. Dans ce cas un modèle mathématique proposé par Behnajady et al. (2007) [249] sera utilisé.

Ce modèle est exprimé par l'expression IV.16.

$$\frac{C}{C_0} = 1 - \frac{t}{m+b.t} \quad (\text{IV.16})$$

**Tableau IV.7.** Paramètres des modèles cinétiques d'ordre 1 et d'ordre 2 et coefficients de corrélation pour la décoloration de JD 106 par le traitement Fenton

Colorant JD106 Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	Modèle cinétique du 1 <sup>er</sup> ordre		Modèle cinétique du 2 <sup>ème</sup> ordre	
	k <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	k <sub>2</sub> (L.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
10	0,117	0,587	0,290	0,856
25	0,085	0,429	0,041	0,396
50	0,117	0,585	0,046	0,579
65	0,062	0,664	0,004	0,813
80	0,042	0,729	0,001	0,817

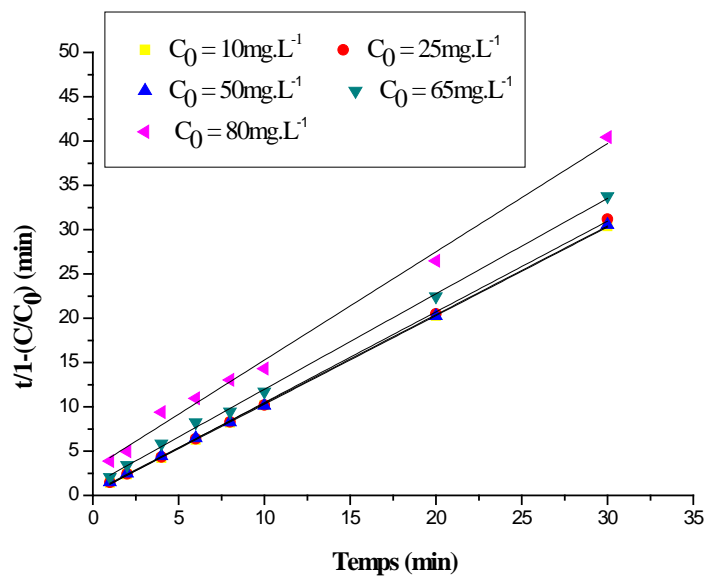
**Tableau IV.8.** Paramètres des modèles cinétiques d'ordre 1 et d'ordre 2 et coefficients de corrélation pour la décoloration de BD 77 par le traitement Fenton

Colorant BD77 Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	Modèle cinétique du 1 <sup>er</sup> ordre		Modèle cinétique du 2 <sup>ème</sup> ordre	
	k <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	k <sub>2</sub> (L.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
10	0,12378	0,359	0,433	0,354
25	0,10517	0,42624	0,068	0,261
50	0,10311	0,43703	0,027	0,471
65	0,07322	0,7275	0,006	0,886
80	0,03518	0,63139	0,001	0,737

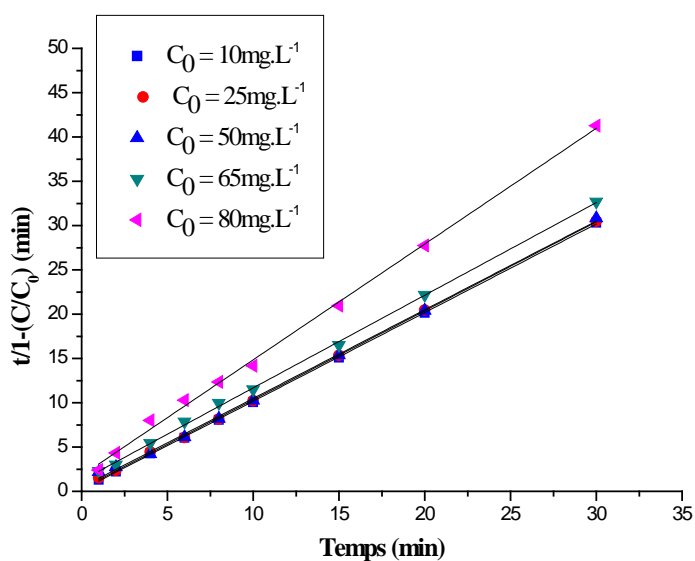
La transformation linéaire de l'équation IV.16 donne :

$$\frac{t}{1-(C_t/C_0)} = m + b.t \quad (\text{IV.17})$$

La représentation graphique de cette équation pour les différentes concentrations initiales des deux colorants est illustrée sur les figures IV.32 et IV.33.



**Figure IV.32.** Modélisation de cinétique de décoloration de JD 106 par oxydation Fenton (pH 2,  $\text{H}_2\text{O}_2 = 8 \text{ mM}$ ,  $\text{Fe}^{2+} = 2.5 \text{ mM}$ )



**Figure IV.33.** Modélisation de cinétique de décoloration de BD 77 par oxydation Fenton (pH 2,  $\text{H}_2\text{O}_2 = 5 \text{ mM}$ ,  $\text{Fe}^{2+} = 1.25 \text{ mM}$ )

Les constantes  $m$  et  $b$  du modèle sont calculées et données dans le tableau IV.9.

**Tableau IV.9.** Paramètres du modèle cinétique de Behnajady et al. (2007) [249] et coefficients de corrélation pour la décoloration par traitement Fenton

Colorant	JD 106			BD 77		
	b	m (min)	R <sup>2</sup>	b	m (min)	R <sup>2</sup>
Concentration initiale (mg.L <sup>-1</sup> )						
10	1.001	0.278	0.999	1.001	0.160	0.999
25	1.024	0.240	0.999	1.004	0.292	0.999
50	1.000	0.391	0.999	1.001	0.478	0.998
65	1.077	1.204	0.999	1.046	1.222	0.999
80	1.222	3.054	0.995	1.306	1.785	0.998

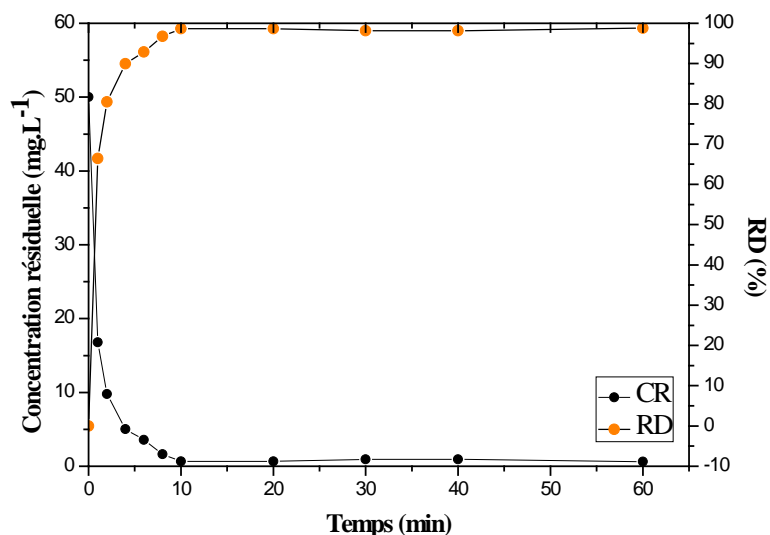
Les coefficients de corrélation du modèle appliqué pour toutes les concentrations initiales sont supérieurs à 0.99, donc le modèle de Behnajady et al. (2005) [249] est le meilleur modèle qui décrit l'oxydation Fenton de JD 106 et de BD 77.

#### *IV.4.6. Cinétique de décoloration aux conditions optimales*

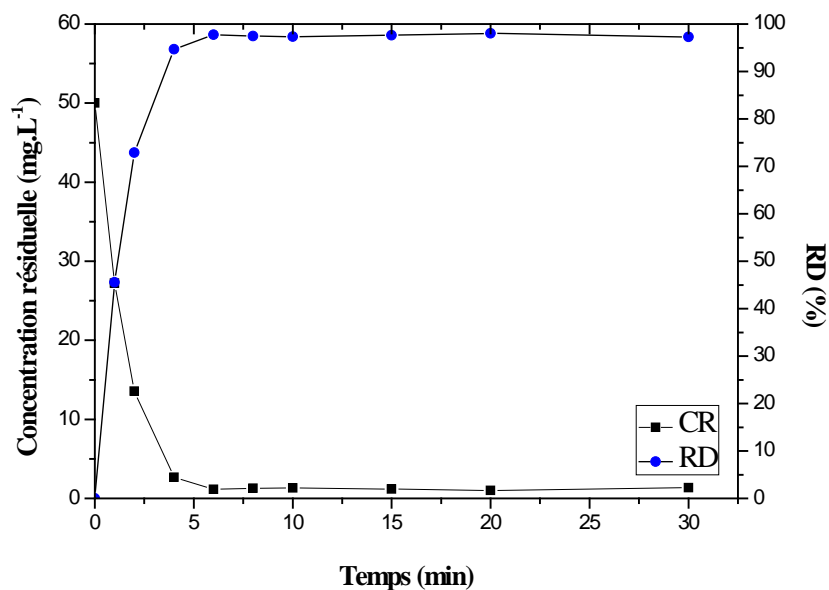
Aux conditions optimales (tableau IV.10), une étude cinétique pour une concentration initiale de 50 mg.L<sup>-1</sup> de chaque colorant est présentée sur les figures IV.34 et IV.35.

**Tableau IV.10.** Conditions optimales du traitement des colorants JD 106 et BD 77 par le procédé Fenton

Colorant	JD 106	BD 77
pH	2	2
Concentration du colorant (mg.L <sup>-1</sup> )	50	50
Concentration de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	8	5
Fe <sup>2+</sup> (mM)	2.5	1.25
RD (%)	98.66	97.73



**Figure IV.34.** Cinétique de décoloration de JD 106 par traitement Fenton (pH 2,  $[H_2O_2] = 8 \text{ mM}$ ,  $[Fe^{2+}] = 2.5 \text{ mM}$ ,  $[JD 106] = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ )



**Figure IV.35.** Cinétique de décoloration de BD 77 par traitement Fenton (pH 2,  $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$ ,  $[Fe^{2+}] = 1.25 \text{ mM}$ ,  $[BD 77] = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ )

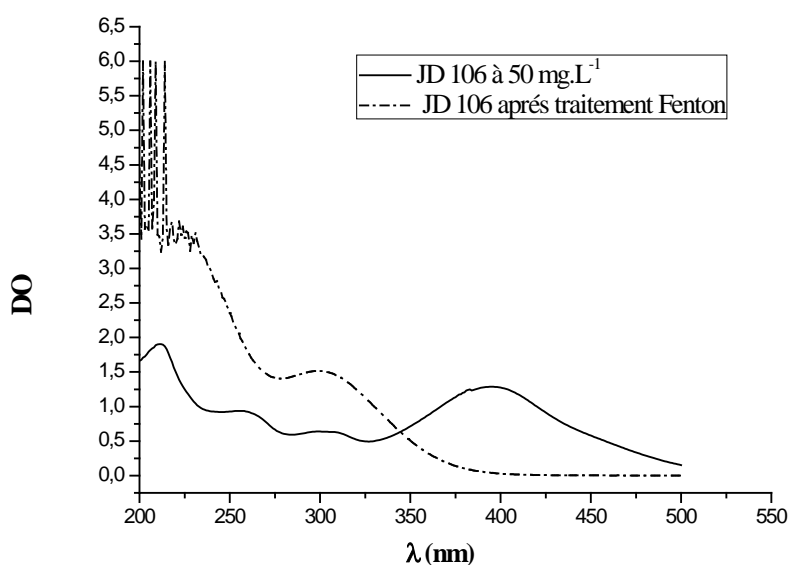
De ces figures, la concentration initiale diminue de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $0.67 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le JD 106 et à  $1.13 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le BD 77 pendant 10 et 6 min, respectivement. Donc le procédé Fenton a donné des RD plus élevés que le procédé enzymatique. Cependant, ces RD sont atteints, à des doses de ions ferreux de 140 et de  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  considérées très élevées par rapport aux celles décrites dans les normes des rejets liquides industriels.

#### IV.4.7. Caractérisation spectrale des surnageants et des précipités

##### A. Analyse par spectrophotométrie UV-visible

Les surnageants des solutions traitées par le procédé Fenton aux conditions optimales sont analysés par spectrophotométrie UV-visible en balayant la longueur d'onde de 200 à 500 nm pour le JD 106 et de 200 à 800 nm pour le BD 77.

Cette analyse des solutions de colorants et des surnageants à la fin du traitement Fenton, a donné des résultats présentés sur les figures IV.36 et IV.37. (Les surnageant et les précipités obtenus après le traitement Fenton des deux colorants sont présentés sur les photos 7.2 de l'annexe 7).



**Figure IV.36.** Spectres UV-visible de la solution initiale (50 mg.L<sup>-1</sup>) de JD 106 et du surnageant après traitement Fenton sous conditions optimales

##### 1. Cas du surnageant JD106

Une disparition complète de la bande d'absorption dans la zone du visible est observée. Ce qui confirme la transformation du groupement azoïque. De plus, les fortes absorptions du spectre du surnageant se localisent aux longueurs d'onde dans la zone de 300 nm et entre 200 et 250 nm.

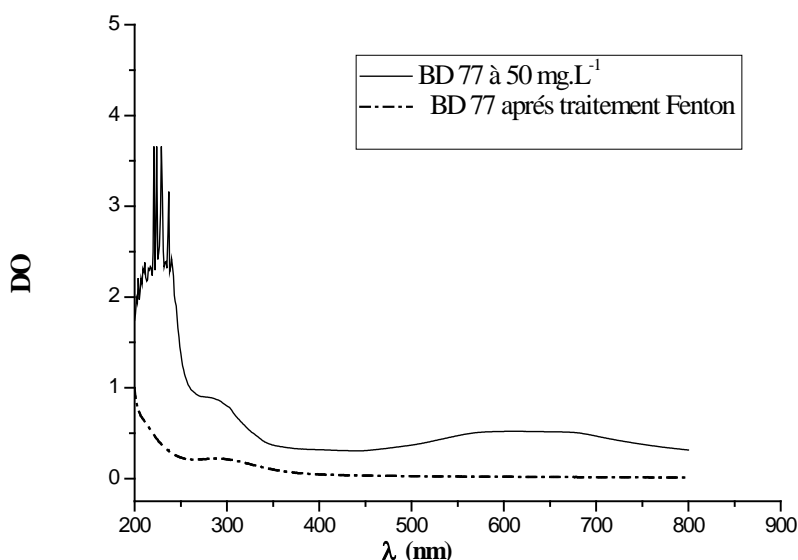
Cela est dû à l'existence des absorptions de la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Cependant, leur transformation nécessite une forte énergie ce qui est difficile par le procédé Fenton où les radicaux hydroxyle attaquent plus facilement les doubles liaisons  $-\bar{N} = \bar{N} -$  en

provoquant leur ouverture (avec une énergie minimale des transitions  $n \rightarrow \pi^*$ ) d'où un maximum de décoloration [251, 252].

Néanmoins, dans le travail rapporté par Hisaindee et al. (2013) [253], il a été démontré que les produits intermédiaires détectés en premier durant les réactions radicalaires sous l'action des radicaux hydroxyles, sont ceux résultants de l'addition de ces radicaux sur le doublet libre de l'azote (réaction IV.18) :



Dans la même étude, il a été cité que différents produits peuvent être formés durant le clivage du groupement azo par les radicaux hydroxyles, cela dépend essentiellement des conditions opératoires. Ces produits peuvent être des amines, des imines, diazène, etc [253].



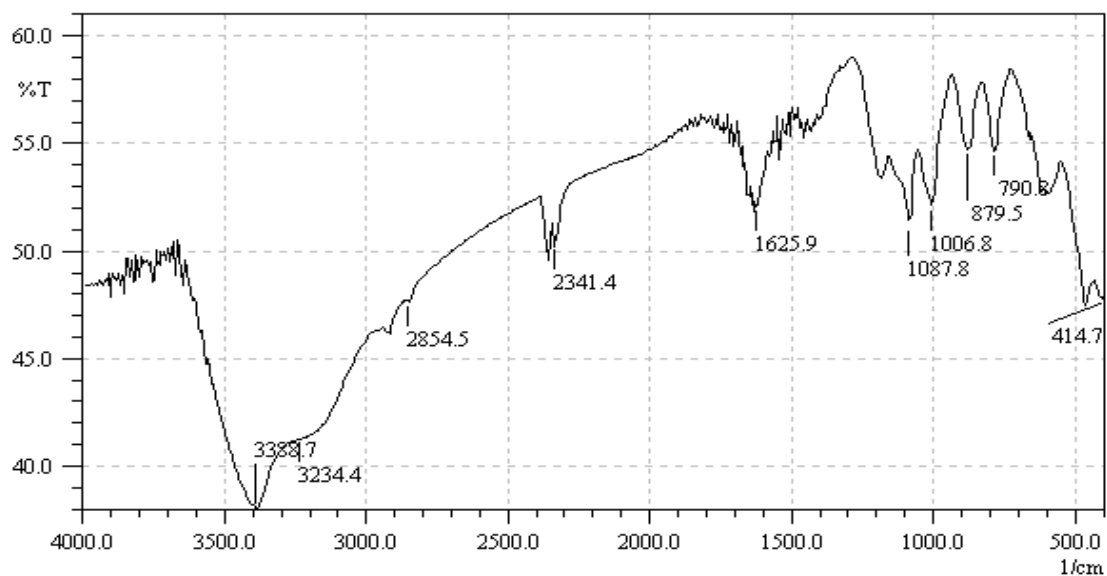
**Figure IV.37.** Spectres UV-vis de la solution initiale ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de BD 77 et du surnageant après traitement Fenton sous conditions optimales

## 2. Cas du surnageant BD 77

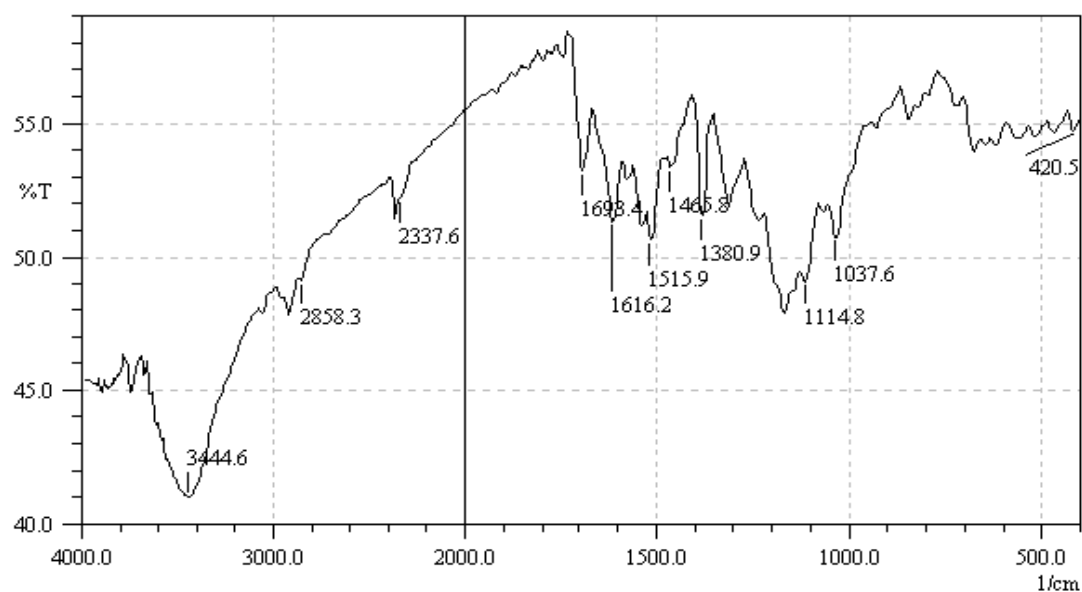
A l'issue du spectre de la figure IV.37, une très légère absorption apparaît dans à 300 nm. La transformation du groupement chromophore et des cycles aromatiques ait lieu par le procédé Fenton.

### B. Analyse des précipités par spectroscopie FTIR

Les spectres IR des précipités récupérés à la fin du traitement chimique par Fenton des deux colorants (JD 106 et BD 77) aux les conditions optimales sont illustrés sur les figures IV.38 et IV.39.



**Figure IV.38.** Spectre IR du précipité récupéré après traitement Fenton de JD 106 sous conditions optimales



**Figure IV.39.** Spectre IR de précipité récupéré après traitement Fenton de BD 77 sous conditions optimales

### **1. Cas du précipité JD 106**

Les principaux pics apparaissent aux 1087.8 et 879.5  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations de déformation des liaisons C-H des cycles aromatiques et le pic à 790.8  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la déformation =C-H des aromatiques substitués. La présence de vibration au nombre d'onde de 1190  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée à l'élongation C-N des amines aromatiques [242].

### **2. Cas du précipité BD 77**

Les principales absorptions se localisent aux :

- C=C cycles aromatiques : 1616, 1515 et 1461  $\text{cm}^{-1}$
- C-H des cycles aromatiques monosubstitués à 690  $\text{cm}^{-1}$
- C-H des cycles aromatiques disubstitués à position para à 860  $\text{cm}^{-1}$ .
- C=O des acides aromatiques à 1698  $\text{cm}^{-1}$ .

### **IV.4.8. Conclusion**

L'objectif de ce traitement était d'étudier la performance du processus Fenton, qui est parmi les POA utilisés dans la dégradation des colorants. Pour cela, nous avons utilisé des solutions contenant séparément un colorant azoïque et anthraquinonique. Le procédé Fenton a montré son efficacité en terme de RD. Les résultats expérimentaux établis prouvent que le pH, les concentrations initiales de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de  $\text{Fe}^{2+}$  et de colorant affectent fortement la décoloration. Des valeurs de 98.66 et 97.73 % ont été atteints pendant 10 et 6 min pour JD 106 et BD 77, respectivement.

Ainsi, l'analyse spectrale montre que les radicaux hydroxyle sont capables d'agir sur les groupements chromophores des molécules des deux colorants et cela aux conditions optimales.

Etant donné que les concentrations des cations ferreux sont de 2.5 mM et de 1.5 mM ce qui correspondent aux masses de 140 et de 70  $\text{mg.L}^{-1}$ , ces valeurs sont supérieures à celles données par la législation Algérienne (3  $\text{mg.L}^{-1}$ ) des rejets liquides industriels [83], d'où, nous proposons de la minimiser en proposant le traitement par couplage.

#### **IV.5. Décoloration par couplage des procédés enzymatique-Fenton**

Il a été démontré que l'utilisation des procédés enzymatiques et celui de Fenton pour le traitement des deux colorants : JD 106 et BD 77, sont des méthodes efficaces, rapides et simples dans leurs mises en œuvre.

Néanmoins, certaines contraintes ou inconvénients doivent être mentionnés telles que :

- Les surnageants récupérés après traitement enzymatique contiennent des molécules aromatiques qui absorbent dans l'UV ;
- Le surnageant récupéré du traitement Fenton du JD 106 présente une forte absorption dans la région de l'UV;
- Le traitement Fenton, a donné pour les deux colorants des RD élevés, mais pour des doses de fer de 140 et de 70 mg.L<sup>-1</sup>. Ce qui n'est pas conforme aux normes des rejets;
- Les rendements de décoloration atteints avec le traitement enzymatique ne répondent pas à notre objectif (décoloration maximale).

Vue l'analogie existante entre les deux procédés (présence de fer, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH optimal) et dans le but de réduire les contraintes d'ordre quantitatif et qualitatif, il nous a paru judicieux d'exploiter la complémentarité entre les deux procédés à travers l'étude de couplage séquentiel et simultané des procédés enzymatiques en Fenton.

##### ***IV.5.1. Procédé séquentiel : Fenton-C-peroxydase libre***

En premier lieu, les surnageants des colorants obtenus par le procédé Fenton sont traités par la C-peroxydase en variant les valeurs d'AE. Avant de procéder au traitement enzymatique, la quantité de peroxyde d'hydrogène est dosée à la fin du traitement Fenton afin d'assurer la concentration favorable au traitement enzymatique.

Pour différentes concentrations des ions ferreux, les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le mélange traité par le procédé Fenton sont récapitulées sur le tableau IV.11.

**Tableau IV.11.** Valeurs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dosées après traitement Fenton (pH 2, [colorant]= 50 mg.L<sup>-1</sup>)

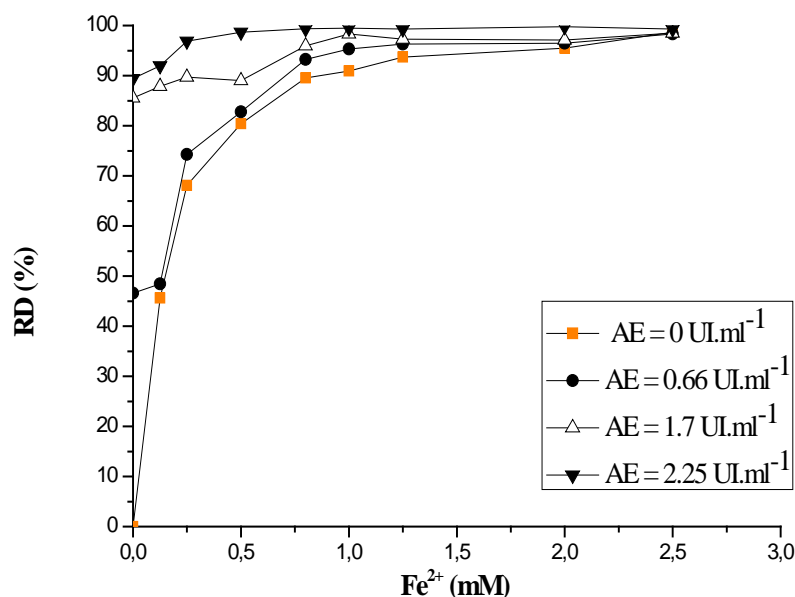
<b>Colorant</b>		
<b>Fe<sup>2+</sup> (mM)</b>	<b>JD 106</b>	<b>BD 77</b>
<b>0.125</b>	2.29	3.85
<b>0.25</b>	1.98	3.04
<b>0.5</b>	----	2.23
<b>0.8</b>	1.63	-----
<b>1</b>	1.39	-----
<b>1.25</b>	1.25	0.49
<b>2</b>	1.17	-----
<b>2.5</b>	0.87	

Avec le colorant JD 106, une concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 8 mM est nécessaire pour déclencher le traitement Fenton. La concentration résiduelle a une dose (~1mM) suffisante pour poursuivre le traitement par la C-peroxydase.

Avec le colorant BD 77, une concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 5 mM est nécessaire pour déclencher le traitement Fenton. La concentration résiduelle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est donc < 10 mM, d'où une concentration de complémentaire est ajoutée pour atteindre 10 mM nécessaire au traitement enzymatique.

Le peroxyde d'hydrogène entre dans les réactions Fenton dans trois mécanismes, avec Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>, avec les molécules organiques et avec les radicaux. De ce fait, la proportionnalité de consommation des réactifs Fenton est estimée pour des teneurs de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> très supérieures que celle de Fe<sup>2+</sup> [254].

Les figures IV.40 et IV.41 illustrent la variation de RD en fonction de la concentration du Fe<sup>2+</sup> suivie de traitement enzymatique à différentes AE.



**Figure IV.40.** Variation de RD de JD 106 en fonction de la concentration de Fe<sup>2+</sup> aux différentes AE pour le couplage séquentiel F-E (pH 2, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 8 mM, [JD 106] = 50 mg.L<sup>-1</sup> et T<sub>ambiante</sub>)

### 1. Cas du colorant JD 106

Les ions ferreux est l'un des paramètres importants pour déclencher le processus d'oxydation radicalaire. L'augmentation de sa concentration montre une décoloration maximale de JD 106 en absence ou en présence d'enzyme.

Aux faibles valeurs d'AE (0.66 UI.ml<sup>-1</sup>), le couplage avec le procédé enzymatique ne provoque pas une modification significative du RD pour des doses de Fe<sup>2+</sup> variant de 0.125 mM à 0.5 mM, cette amélioration ne varie que de 2.86 et de 2.7 % pour ces doses, respectivement. En effet, à partir d'une AE de 1.7 UI.ml<sup>-1</sup>, le rendement s'améliore de 48 % et de 10 % pour les mêmes teneurs de Fe<sup>2+</sup>.

Pour une AE de 2.25 UI.ml<sup>-1</sup>, l'amélioration de RD de 98.66 % est atteint pour une dose en Fe<sup>2+</sup> de 0.5 mM, cette valeur est faible par rapport à celle utilisée dans le traitement Fenton individuel (2.5 mM).

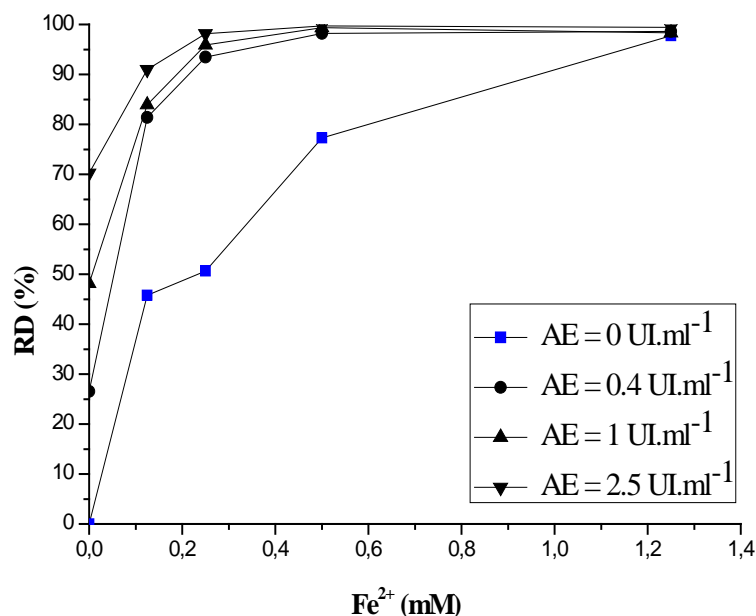
### 2. Cas du colorant BD 77

En absence d'enzyme, le procédé Fenton a donné un maximum de décoloration à une dose de fer de 1.25 mM. Aux faibles AE (0.4 UI.ml<sup>-1</sup>), le couplage avec le procédé enzymatique améliore considérablement le RD pour des teneurs de Fe<sup>2+</sup> allant de 0.125 à 0.25 mM, cette amélioration est de l'ordre de 45 %.

Pour des AE plus élevées (AE ≥ 1 UI.ml<sup>-1</sup>) et pour des doses de Fe<sup>2+</sup> variant de 0.125 à 0.25 mM, le RD augmente de plus de 48 %. Ainsi, en augmentant la concentration des

cations  $\text{Fe}^{2+}$  de plus de 0.25 mM, le RD ne varie pas d'une manière significative, d'où un maximum de décoloration (98.16 %) est atteint pour une  $\text{AE} = 2.5 \text{ UI.ml}^{-1}$  et une  $[\text{Fe}^{2+}] = 0.25 \text{ mM}$ .

Donc, on peut conclure que cette combinaison permet de réduire la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  utilisée.



**Figure IV.41.** Variation de RD de BD 77 en fonction de la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  pour différentes AE pour le procédé séquentiel F-E ( $\text{pH } 2$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mM}$ ,  $[\text{BD } 77] = 50 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $T_{\text{ambiante}}$ )

#### IV.5.2. Procédé séquentiel : C-peroxydase libre-Fenton

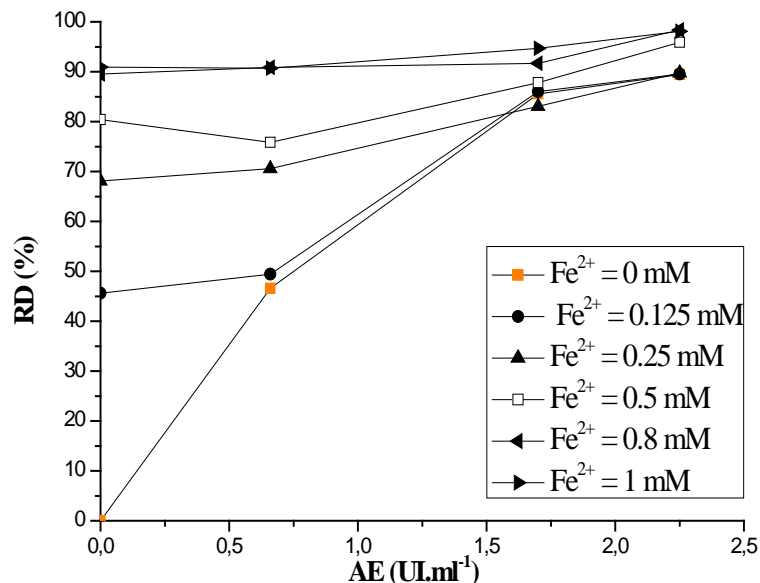
Les surnageants récupérés après traitement par la C-peroxydase, subissent un traitement Fenton par addition d'une dose de  $\text{Fe}^{2+}$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dans le cas du JD 106, une concentration de 8 mM est ajoutée, tandis que pour le BD 77, les concentrations de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dosées sont présentées dans le tableau IV.12.

**Tableau IV.12.** Valeurs  $\text{H}_2\text{O}_2$  dosées après traitement enzymatique du BD 77 ( $\text{pH } 2$ ,  $[\text{colorant}] = 50 \text{ mg.L}^{-1}$ )

AE ( $\text{UI.ml}^{-1}$ )	Concentration de $\text{H}_2\text{O}_2$ (mM)
0.4	4.81
1	2.52
2.5	1.04

De ce tableau, la quantité de  $H_2O_2$  est ajoutée au surnageant, afin de compléter les 5 mM nécessaire au traitement Fenton.

La représentation de variation des RD des différents essais est illustrée sur les figures IV.42 et IV.43.



**Figure IV.42.** Variation de RD de JD 106 en fonction de l'AE pour différentes concentrations de  $Fe^{2+}$  par traitement séquentiel E-F (pH 2,  $[H_2O_2] = 8$  mM,  $[JD\ 106] = 50$  mg.L<sup>-1</sup> et  $T_{\text{ambiante}}$ )

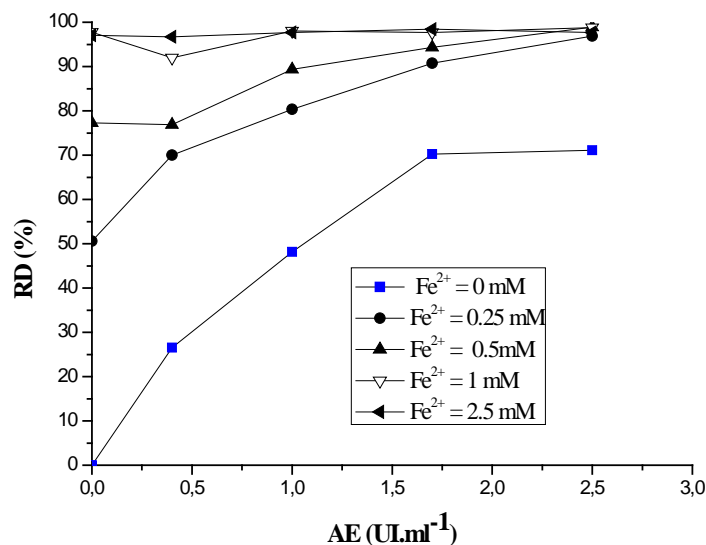
### 1. Cas du colorant JD 106

L'AE est un facteur important dans l'amélioration du RD. Cependant, toutes les solutions récupérées après le traitement enzymatique, montrent que l'amélioration de décoloration dépend de la teneur des ions ferreux dans le milieu réactionnel.

D'après la figure IV.42, aux faibles doses de  $Fe^{2+}$  (0.125 mM), le couplage avec le procédé Fenton améliore le RD pour des AE variant de 0.66 à 2.25 UI.ml<sup>-1</sup> de moins de 3 % seulement.

Pour des concentrations de  $Fe^{2+}$  plus élevées (de 0.25 à 0.8 mM), le RD est amélioré de 34 % à 48.6 %.

Pour des doses plus élevées de  $Fe^{2+}$  et pour des AE élevées ( $AE \geq 1.7$  UI.ml<sup>-1</sup>) n'affecte une amélioration significative sur la décoloration que pour une AE de 2.25 UI.ml<sup>-1</sup> et une concentration de  $Fe^{2+}$  égale à 0.5 mM où le RD égale 95.85 %.



**Figure IV.43.** Variation de RD de BD 77 en fonction de l'AE pour différentes concentrations de Fe<sup>2+</sup> par couplage séquentiel E-F (pH 2, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 8 mM, [BD 77] = 50 mg.L<sup>-1</sup> et T<sub>ambiante</sub>).

## 2. Pour le colorant BD 77

Aux faibles doses de Fe<sup>2+</sup> (0.25 mM), le couplage avec le procédé Fenton améliore le RD pour des AE variant de 0.4 à 1 UI.ml<sup>-1</sup>, cette amélioration varie de 62 à 40 % respectivement.

Pour des doses plus élevées de Fe<sup>2+</sup> allant de 0.5 à 2.5 mM et pour une AE de 0.4 UI.ml<sup>-1</sup>, le RD a amélioré de 65.5 à 72.55, respectivement.

L'augmentation de la dose de Fe<sup>2+</sup> pour des AE dépassant 1.75 UI.ml<sup>-1</sup> n'apporte aucune modification significative au rendement d'élimination.

L'amélioration de la décoloration dans le procédé séquentiel est importante pour une AE de 2.25 UI.ml<sup>-1</sup> et une concentration de Fe<sup>2+</sup> égale à 0.5 mM où le RD est égale à 96.88 %.

En conclusion, on pourra mener le procédé couplé E-F à de faibles doses de Fe<sup>2+</sup> (0.5 et 0.25 mM pour le JD 106 et le BD 77, respectivement) et à une AE de l'ordre de 2.5 UI.ml<sup>-1</sup>, pour réaliser une élimination presque complète du colorant. De même que pour le premier mode de couplage, ce procédé a permis de réduire la concentration du Fe<sup>2+</sup> de 80 % pour les deux colorants.

Dans le cas de ce type de combinaison, la nature de la molécule à traiter affecte fortement le choix du procédé séquentiel, à cause peut être de la nature des produits générés par l'une ou l'autre réaction. Des études de couplage séquentiel chimique-enzymatique (avec la

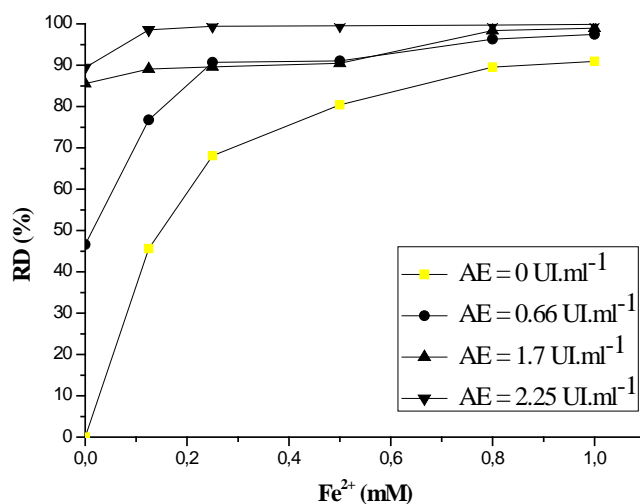
laccase et la peroxydase) durant le traitement des effluents colorés de l'industrie papetière et d'imprimerie, ont montré que ce mode de couplage donne une décoloration maximale [199].

### IV.5.3. Décoloration par couplage simultané C-peroxydase libre-Fenton

Vu qu'une certaine synergie a été démontrée par les résultats obtenus lors des couplages séquentiels, il paraît judicieux d'étudier la faisabilité du procédé simultané en batch unique, surtout que les deux procédés sont réalisés à pH optimal identique en présence d'une concentration de  $H_2O_2$  du même ordre de grandeur. Un procédé de ce type sera donc plus flexible et plus rentable.

Dans ce cas, l'optimisation a été limitée aux facteurs  $Fe^{2+}$  et AE sous des conditions constantes : température ambiante, pH 2,  $[H_2O_2] = 8$  mM et 10 mM pour le JD 106 et BD 77, respectivement,  $[colorant] = 50$  mg.L<sup>-1</sup>.

Les résultats sont illustrés sur les figures IV.44 et IV.45 pour les deux colorants.



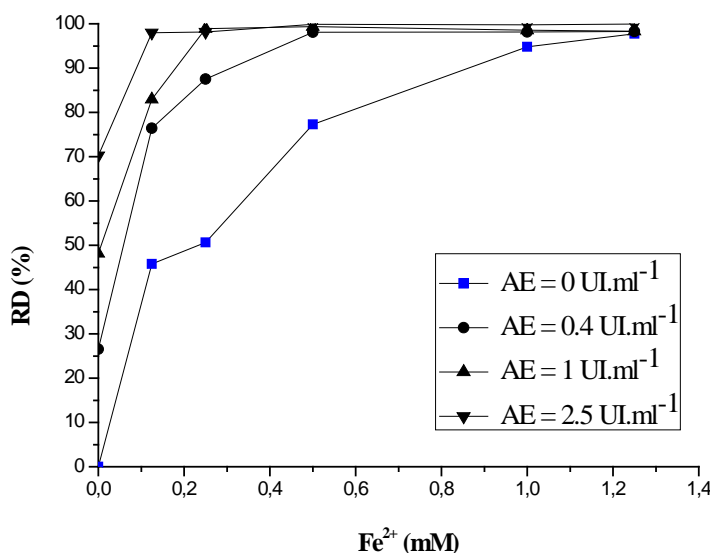
**Figure IV.44.** Variation de RD de JD 106 en fonction de la concentration de  $Fe^{2+}$  pour différentes AE ; cas du couplage simultané C-peroxydase libre/Fenton. (pH 2,  $[H_2O_2] = 8$  mM,  $[JD\ 106] = 50$  mg.L<sup>-1</sup> et  $T_{ambiante}$ )

#### 1. Cas du colorant JD 106

Aux faibles valeurs d'AE (0.66 UI.ml<sup>-1</sup>), le RD augmente avec la concentration de  $Fe^{2+}$ . Pour la gamme de  $Fe^{2+}$  variant de 0.125 à 0.25 mM, le RD augmente de 15 %. Pour des doses plus élevées de fer, l'amélioration devient peu significative.

Pour des AE plus élevées ( $> 1.7$  UI/ml), l'amélioration du RD est moins nette (de l'ordre de 10 %) et l'influence de l'augmentation de la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  est peu significative. Donc un maximum de décoloration (98.55 %) est atteint à une  $\text{AE} = 2.25$  UI.ml<sup>-1</sup> et une concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  de 0.125 mM.

En conclusion, le procédé simultané est réalisable et permet de minimiser la dose de  $\text{Fe}^{2+}$  pour atteindre une performance identique à celle obtenue avec des séquences F-E et E-F.



**Figure IV.45.** Variation de RD de BD 77 en fonction de la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  pour différentes AE ; cas du couplage simultané C-peroxydase libre/Fenton. (pH 2,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10$  mM,  $[\text{BD 77}] = 50$  mg.L<sup>-1</sup> et  $T_{\text{ambiante}}$ )

## 2. Cas du colorant BD 77

À une AE de 0.4 UI.ml<sup>-1</sup>, le rendement de décoloration augmente avec la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$ . Pour des concentrations de  $\text{Fe}^{2+}$  allant de 0.125 à 0.25 mM, le RD augmente de 12.68 % seulement. Pour des doses plus élevées, l'amélioration de RD devient peu significative.

Pour des AE plus élevées ( $> 1$  UI.ml<sup>-1</sup>), l'amélioration est moins nette et l'influence de l'augmentation de la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  est non significative.

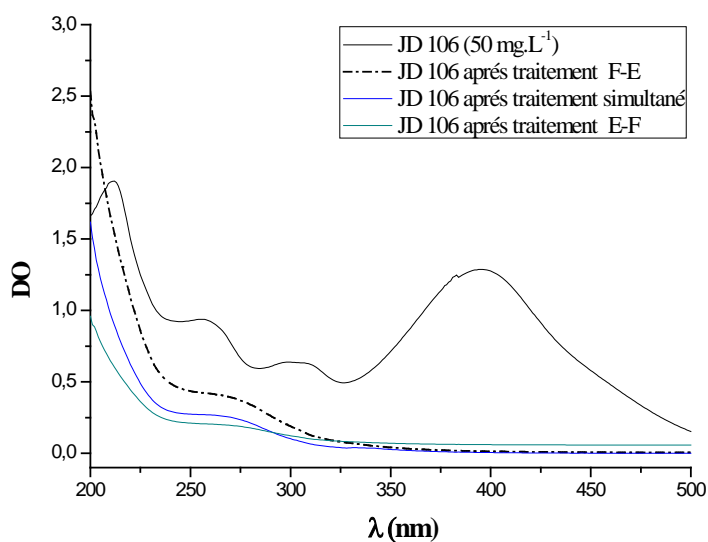
La décoloration est maximale à partir d'une concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  de 0.125 mM et une AE de 2.5 UI.ml<sup>-1</sup>.

En conclusion, le procédé simultané est réalisable et permet de minimiser la dose de  $\text{Fe}^{2+}$  de plus de 90 % de la dose utilisée dans le traitement par le procédé Fenton seul. Cette teneur de fer a permis d'atteindre une performance identique à celle obtenue avec des séquences F-E et E-F.

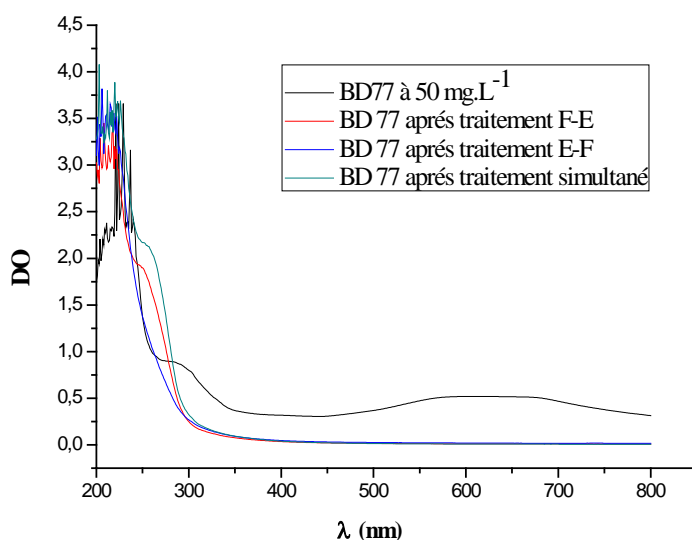
#### IV.5.4. Caractérisation spectrale des produits de dégradation des procédés de couplage

##### A. Analyse des surnageants par spectrophotométrie UV-visible

A la lumière des résultats obtenus en terme de RD, les solutions traitées sous conditions optimales par chaque procédé de couplage (séquentiel et simultané), sont analysées par spectrophotométrie UV-visible en balayant le domaine de longueurs d'ondes de 200 à 800 nm. Cette analyse des solutions des colorants et leurs solutions après traitement par différents procédés est présentée sur les figures IV.46 et IV.47.



**Figure IV.46.** Spectres UV-visible de la solution JD 106 à la concentration initiale ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et les surnageant après les couplages : F-E, E-F et simultané Fenton/peroxydase



**Figure IV.47.** Spectres UV-visible de la solution BD 77 à la concentration initiale ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et les surnageant après les couplages : F-E, E-F et simultané Fenton/peroxydase

A propos des spectres établis, l'analyse permet de comparer qualitativement l'efficacité des procédés appliqués :

### **1. Cas du colorant JD 106**

Une disparition des bandes caractéristiques du JD 106 par les procédés séquentiels : F-E et E-F et par le couplage simultané (aux longueurs d'onde de l'UV de 212, 256 et 298 nm et celle dans le visible à  $\lambda = 396$  nm).

Les spectres des solutions traitées par les trois procédés montrent aussi une réduction significative des pics à 250 nm (amines aromatiques) et à 300 nm comparée à l'absorption du surnageant issu du procédé Fenton seul.

Un résultat très important est celui concernant l'absorption du spectre du surnageant obtenu après traitement séquentiel E-F qui ne présente pas d'absorption dans la zone UV malgré que le RD atteint est de 95.88 %.

Cependant, la réduction de l'absorbance à la longueur d'onde de 226 nm (caractéristiques des cycles benzéniques associée au groupement chromophore) peut être due à la transformation des cycles aromatiques. Cette modification d'absorbance dans la région UV et visible des spectres des procédés combinés peut confirmer une minéralisation partielle de la molécule du colorant azoïque [244].

A cet égard, la disparition ou la réduction des bandes d'absorption après traitement par les procédés combinés montre que les produits générés par un procédé seront éliminés durant le second et l'oxydation des amines aromatiques peut être réalisable par C-peroxydase ou par les réactifs Fenton [135, 255].

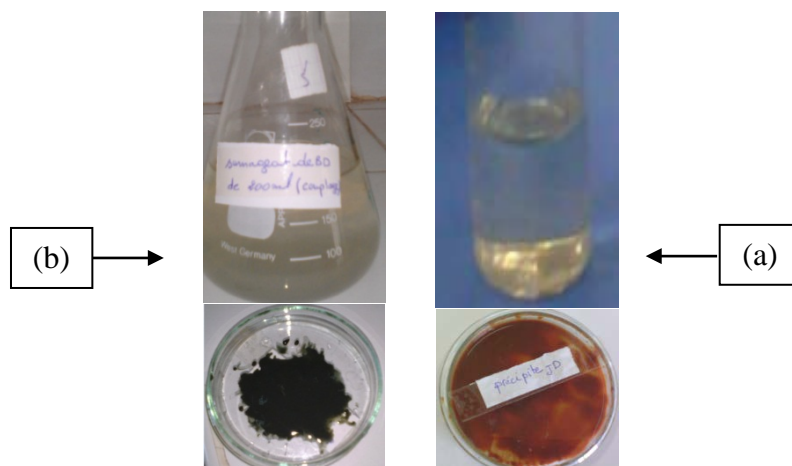
### **2. Cas du colorant BD 77**

Les spectres issus des trois couplages sont comparables : ils conduisent tous à une transformation du chromophore anthraquinone.

Dans l'intervalle allant de 200 à 300 nm, il y a une bande d'absorption pour les trois spectres, mais le couplage E-F présente des absorptions inférieures en comparaison avec les deux autres.

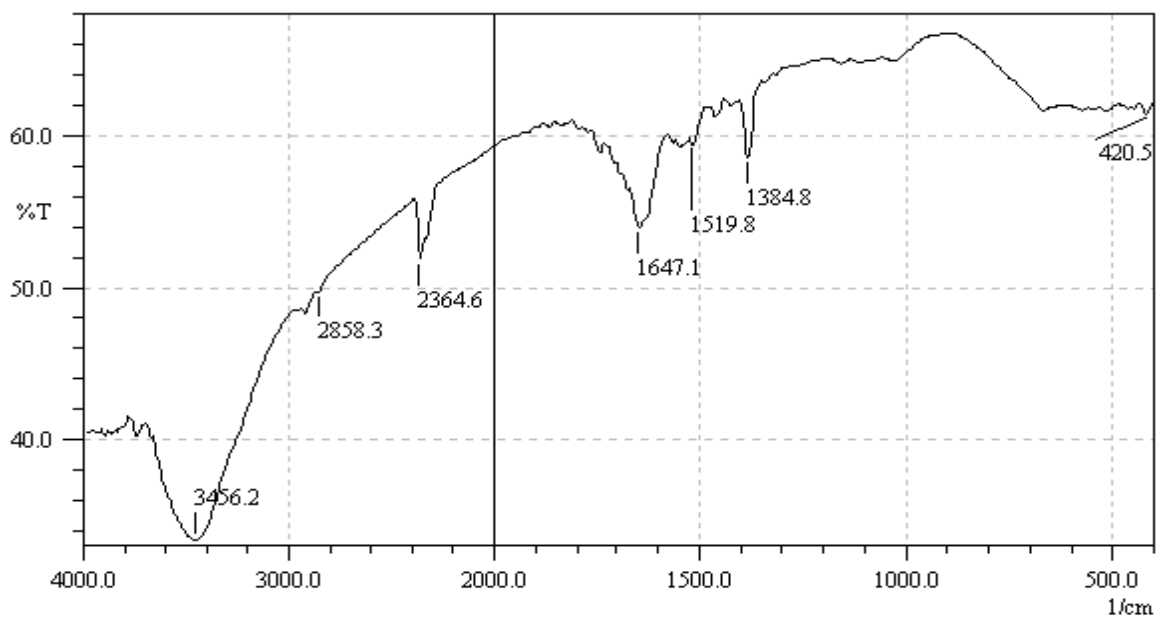
## **B. Analyse des précipités par spectroscopie FTIR**

Les réactions d'oxydation par les radicaux hydroxyles (provenant des réactifs Fenton) et par la C-peroxydase conduisent simultanément à la précipitation de certains produits. Cela est représenté sur les photos IV.2.

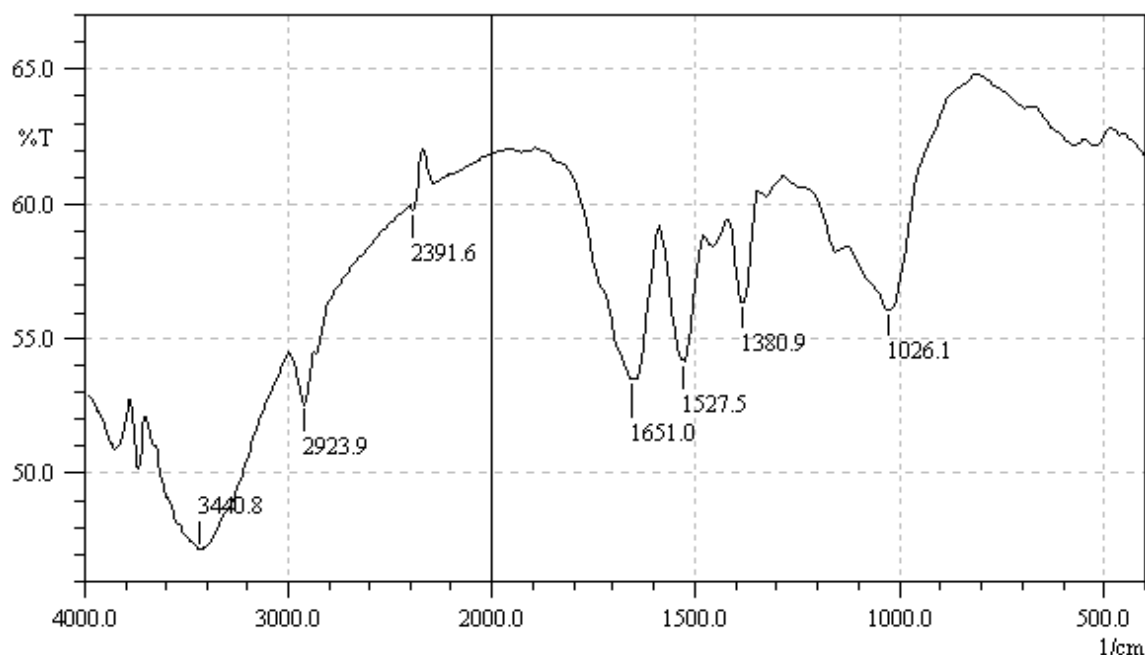


**Photos IV.2.** Solutions des surnageants et les précipités et après traitement sous conditions optimales par couplage simultané des procédé, (a) : JD 106 et (b) : BD 77

Les précipités des deux colorants issus du couplage simultané ont été analysés par FTIR après séchage et leurs spectres IR sont donnés sur les figures IV.48 et IV.49.



**Figure IV.48.** Spectre IR de précipité de JD 106 récupéré après traitement de couplage simultané Fenton/peroxydase libre sous conditions optimales



**Figure IV.49.** Spectre IR de précipité de BD 77 récupéré après traitement de couplage simultané Fenton/peroxydase libre sous conditions optimales

### 1. Cas du colorant JD 106

Le spectre de la figure IV.48 est moins chargé que les spectres des figures IV.23 et IV.38 et contient des pics de faible intensité de transmission.

Le pic caractéristique de la liaison azo n'est pas présent dans le spectre, mais un pic à  $1647.1 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à la déformation de la liaison N-H des aromatiques. Le pic à  $1384.8 \text{ cm}^{-1}$  apparaît dans le spectre du JD 106, du précipité du traitement enzymatique et dans ce spectre. Ce qui peut être interprété par l'élongation de la liaison N-C des amines aromatiques tertiaires.

### 2. Cas du colorant BD 77

Il est important de comparer les spectres des précipités formés par chaque procédé individuel et couplé. La comparaison permet de constater que les spectres de précipité de traitement enzymatique et celui du procédé simultané sont identiques et avec des intensités comparables. Cela prouve la constatation de minéralisation des molécules de BD 77 par le procédé Fenton et que tous les produits constituant le précipité sont générés par la réaction enzymatique.

### C. Analyse par CLHP

L'analyse par CLHP a donné les chromatogrammes correspondants pour les solutions des colorants et leurs produits de transformation des traitements enzymatique par la C-peroxydase libre, par le procédé fenton et leurs combinaisons. Ces chromatogrammes sont illustrés sur les figures des annexes 9 et 10.

Les résultats des temps de rétention et des surfaces des pics sont résumés sur les tableaux IV.13 et IV.14.

**Tableau IV.13.** Valeurs de temps de rétention et de surface des pics du JD 106 et ses produits de transformation par différents procédés appliqués

	<b>JD 106 (50 mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Enzyme</b>	<b>Fenton</b>	<b>F-E</b>	<b>E-F</b>	<b>couplage simultané</b>
<i>Temps de rétention (min)</i>	2.242	2.433	-----	2.292	2.283	2.283
	4.025	3.075	2.997	3.050	3.033	3.042
	-----	-----	4.765	-----	4.767	4.742
	6.817	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Surface de pic</i>	1444000	72301	-----	42778	503835	474616
	2770254	884384	985432	68891	347095	438942
	69299	-----	79356	-----	13295	13109

**Tableau IV.14.** Valeurs de temps de rétention et de surfaces des pics du BD 77 et ses produits de transformation par différents procédés appliqués

	<b>BD 77 (80 mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Enzyme</b>	<b>Fenton</b>	<b>F-E</b>	<b>E-F</b>	<b>Couplage simultané</b>
<i>Temps de rétention (min)</i>	2.242	2.300	2.242	2.325	2.375	2.350
	4.017	3.058	4.100	6.600	6.833	5.775
	6.800	5.033	5.000	-----	-----	6.883
<i>Surface de pic</i>	115244	355329	538402	4494354	2828232	5088698
	1730837	955292	17399	9932	7538	17980
	50712	55436	40561	-----	-----	21186

D'après le tableau IV.13, le colorant JD 106, présente un pic principal à  $t_r = 4.025$  min (de 93% par rapport aux autres pics) et deux pics secondaires (4 et 2%). Cependant, un nouveau pic apparaît à  $t_r \approx 3$  min suite aux traitements appliqués. Dans le cas des traitements avec la C-peroxydase et le Fenton individuellement, ce pic est principal, tandis que pour ceux du couplage, ce pic se divise en deux pics (le deuxième est à  $t_r \approx 2.3$ min).

De ces résultats, il est important de conclure que le colorant est transformé par tous les procédés appliqués, où les produits issus de chacun ne sont pas définis.

Du tableau IV.14, le colorant BD 77, présente aussi un pic principal à  $t_r \approx 4.017$  min (à un pourcentage de 91% par rapport aux autres pics) et deux autres qui représentent 6 et 3%.

Les temps de rétention des pics sont différents par rapport au colorant.

#### ***IV.5.5. Conclusion***

Suite à cette étude qualitative et quantitative de l'efficacité des différents traitements individuels et hybrides, on pourra conclure que le procédé simultané présente des avantages majeurs tels que :

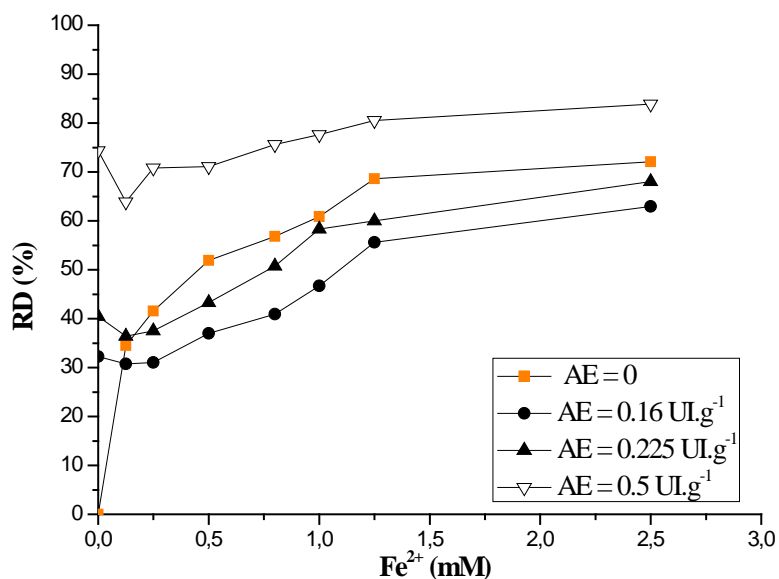
- La réduction de la dose de  $Fe^{2+}$  utilisée ;
- La flexibilité et la simplicité de mise en œuvre qui résulte de la synergie positive et de l'analogie des conditions optimales sous lesquelles les procédés sont conduits (pH, température,  $H_2O_2$ ) ;
- La réduction de la durée de traitement ;
- La réduction des sous-produits de dégradation, en particulier le traitement de couplage simultané de JD 106.

A cet effet, afin d'améliorer l'aspect pratique du procédé pour une éventuelle réutilisation de l'enzyme ou son intégration dans un procédé en continu, il nous a paru nécessaire d'explorer l'utilisation de la peroxydase immobilisée dans le procédé de couplage simultané.

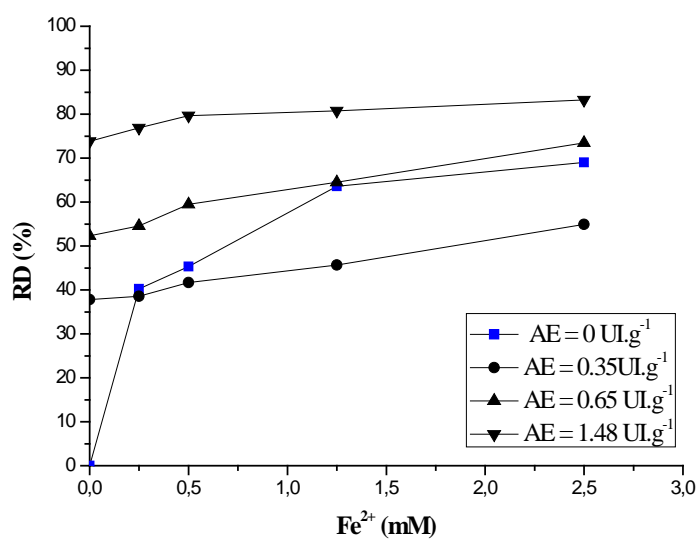
#### **IV.6. Décoloration par couplage simultané C-peroxydase immobilisée-Fenton**

Dans cette partie, nous allons essayer d'atteindre le même objectif d'où, une optimisation des concentrations de catalyseurs sera mise en jeu.

Les variations de RD des colorants en fonction de la concentration de  $Fe^{2+}$  pour trois valeurs d'AE sont représentées sur les figures IV.50 et IV.51



**Figure IV.50.** Variation de RD de JD 106 en fonction de la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  pour différentes AE ; cas de couplage simultané C-peroxydase immobilisée/Fenton. (pH 2,  $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.1\text{M}$ ,  $[\text{JD 106}] = 80 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $T_{\text{ambiante}}$ )



**Figure IV.51.** Variation de RD de BD 77 en fonction de la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$  pour différentes AE ; cas de couplage simultané C-peroxydase immobilisée/Fenton. (pH 2,  $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.12 \text{ M}$ ,  $[\text{BD77}] = 180 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $T_{\text{ambiante}}$ )

De ces figures nous pouvons dire que :

En absence des billes de C-peroxydase, et pour une concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de l'ordre de 0.1 M, le RD augmente avec la concentration du  $\text{Fe}^{2+}$ , jusqu'à la valeur de 2.5 mM pour

atteindre 79% seulement. L'excès de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $> 30 \text{ mM}$  : concentration critique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la réaction Fenton), provoque une production importante des radicaux hydroperoxyde ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) par rapport à celle des radicaux hydroxyle (équations IV.13 et IV.14).

### 1. Cas du colorant JD 106

Avec des AE de 0.16 et de  $0.225 \text{ UI.g}^{-1}$  d'enzyme immobilisée, RD ne varie pas significativement en présence d'une dose de  $\text{Fe}^{2+}$  inférieure à  $0.5 \text{ mM}$ . Au-delà de cette dose, la décoloration augmente de 37 % à une concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  de  $2.5 \text{ mM}$ .

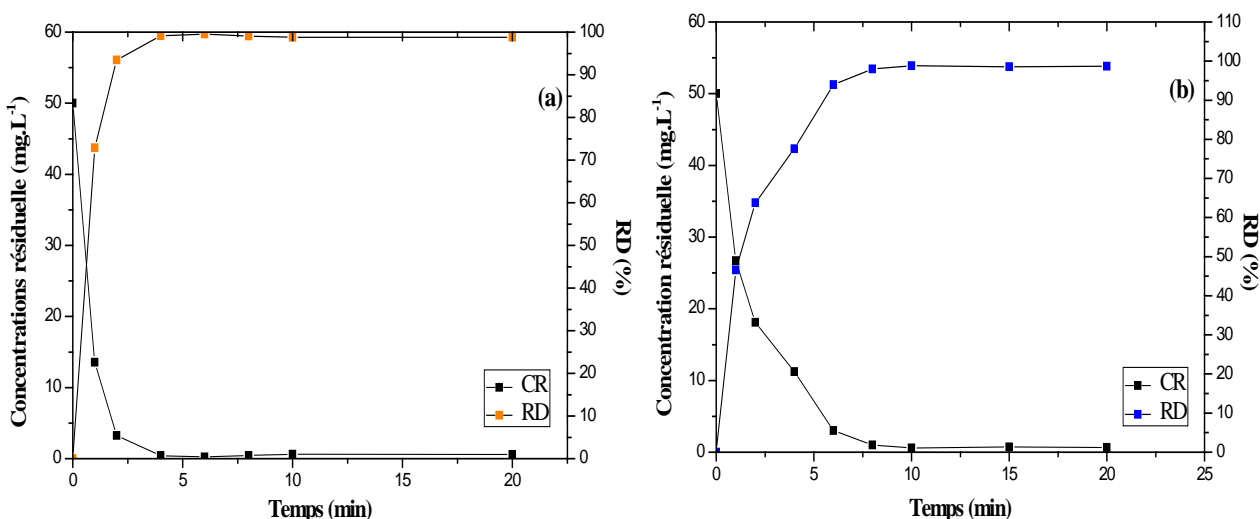
Pour une AE de  $0.5 \text{ UI.g}^{-1}$ , le RD ne varie pas beaucoup avec les ions ferreux et la décoloration est due essentiellement à l'enzyme : variation de 11 % seulement.

### 2. Cas du colorant BD 77

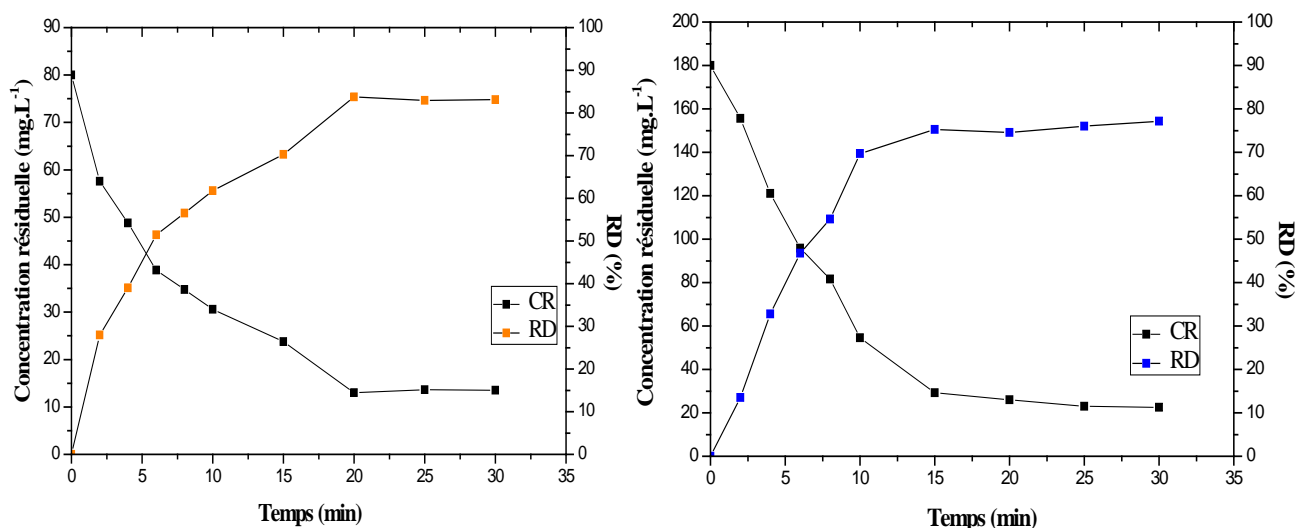
Le même phénomène s'observe par rapport au JD 106, mais la décoloration est plus efficace pour les AE élevées. Pour une AE de  $1.48 \text{ UI.g}^{-1}$  et pour  $[\text{Fe}^{2+}] = 2.5 \text{ mM}$ , le RD est de 83.23 %.

## IV.7. Cinétiques de décoloration par le procédé de couplage simultané

Lors de l'étude de transformation des colorants, la cinétique de décoloration sous les conditions optimales a été suivie. Les figures IV.52 et IV.53, illustrent les variations de RD et de concentrations résiduelles des colorants pour le procédé de couplage simultané en fonction du temps.



**Figure IV.52.** Cinétiques de décoloration de : (a) JD 106 ( $\text{Fe}^{2+} = 0.125 \text{ mM}$ ,  $\text{AE} = 2.25 \text{ UI.ml}^{-1}$ ) et (b) : BD 77 ( $\text{Fe}^{2+} = 0.125 \text{ mM}$ ,  $\text{AE} = 2.5 \text{ UI.ml}^{-1}$ ) par couplage simultané de procédé C-peroxydase libre/Fenton



**Figure IV.53.** Cinétiques de décoloration de : (a) JD 106 ( $\text{Fe}^{2+} = 2.5 \text{ mM}$ ,  $\text{AE} = 0.5 \text{ UI.g}^{-1}$ ) et (b) : BD 77 ( $\text{Fe}^{2+} = 2.5 \text{ mM}$ ,  $\text{AE} = 1.48 \text{ UI.g}^{-1}$ ) par couplage simultané de procédé C- peroxydase immobilisée/Fenton

3. Dans le cas du traitement du couplage avec la C-peroxydase libre, un temps de contact entre 4 et 10 min est suffisant pour atteindre des RD de JD 106 et de BD 77 de l'ordre de 98 %, respectivement. Donc la décoloration est rapide dans le cas du JD 106 que pour le BD 77.

4. Pour le traitement de JD 106 avec la C-peroxydase immobilisée combinée au Fenton, le temps de décoloration est de 20 min et le RD est de l'ordre de 83.76 %. cette valeur a été améliorée par rapport à celles obtenues dans le cas des traitements individuels. Le traitement de BD 77 par le même procédé, dure 25 min, mais donne un rendement plus faible. A signaler que la concentration initiale de colorant dans ce cas est de  $180 \text{ mg.L}^{-1}$ .

#### IV.8. Test de phytotoxicité

Dans le but d'une investigation des effets des surnageants issus des différents traitements sur les plantes, des tests de phytotoxicité ont été menées sur des grains d'haricots. Les critères de suivi sont l'indice de germination (IG) et la longueur moyenne des racines ( $L_{\text{moy}}$ ).

Les tableaux IV.15 et IV.16 récapitulent les différents résultats de phytotoxicité.

**Tableau IV.15.** Test de phytotoxicité de JD 106 et leurs surnageants issus des différents procédés de traitement

	Témoin	<b>JD 106</b>			
		Avant traitement	Après traitement enzymatique	Après traitement Fenton	Après traitement de couplage simultané
<b>IG (%)</b>	100	27.75	77	50.75	97.47
<b>L<sub>moy</sub> (cm)</b>	11.75	6.66	10	6.21	9.42

**Tableau IV.16.** Test de phytotoxicité de BD 77 et leurs surnageant issus des différents procédés de traitement

	Témoin	<b>BD 77</b>			
		Avant traitement	Après traitement enzymatique	Après traitement Fenton	Après traitement de couplage simultané
<b>IG(%)</b>	100	23.43	49	100	74
<b>L<sub>moy</sub> (cm)</b>	11.75	11	8.25	12.8	8.5

Durant les trois premiers jours, aucune germination pour tous grains arrosés par les différentes solutions n'a été observée.

Au quatrième jour les grains ont commencé à germer. Pour ceux arrosés par les solutions des colorants, le nombre de grains qui ont germé était un seul grain pour le colorant JD 106 et un pour le BD 77.

La valeur moyenne des longueurs des 10 tiges d'haricot germées dans l'eau distillée après 21 jours est de 11.75 cm avec 100% d'IG tandis que les valeurs moyennes des longueurs des tiges des solutions des colorants non traités sont 6.66 et 11 cm pour le JD106 et le BD77 respectivement. Pour le BD la plante se développe sans feuilles et son état est sec ainsi que les racines ne sont pas ramifiées (de longueur égale à 1 cm).

Pour les solutions issus du traitement enzymatique, les paramètres de germination du JD 106 (77 % et une longueur de 10 cm) sont supérieurs que ceux du BD 77 (49 % et 8.25 cm) tandis que ceux des solutions du traitement Fenton montrent un phénomène inverse : pour le JD 106 l'IG est de 50.75% (longueur des tiges est de 6.21 cm) et pour le BD 77 l'IG est de 100% (longueur des tiges est de 12.8 cm).

---

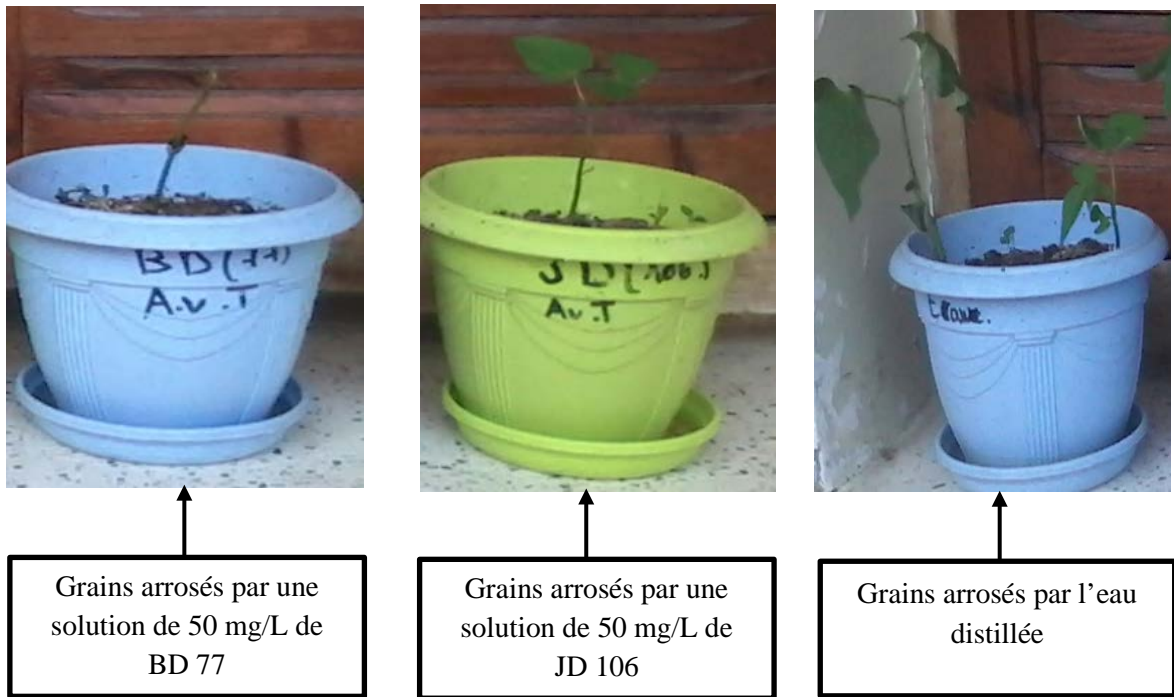
Si on compare les valeurs calculées du traitement couplé, un IG de 97.47 % avec une longueur des tiges de 9.42 cm et un IG de 74% avec une longueur des tiges de 8.5 cm ont été atteint pour le JD 106 et le BD 77, respectivement.

Selon Zacconi et al. (1985) [256], les valeurs de l'IG inférieurs à 50 % représentent une haute phytotoxicité et celles comprises entre 50 et 80 % représentent une phytotoxicité moyenne et ceux supérieurs à 80 % ne présentent pas une phytotoxicité. Donc, la phytotoxicité est réduit dans le cas des traitements enzymatique et Fenton appliqués séparément sur la solution de JD et les solutions du traitement de couplage ne présentent pas de toxicité.

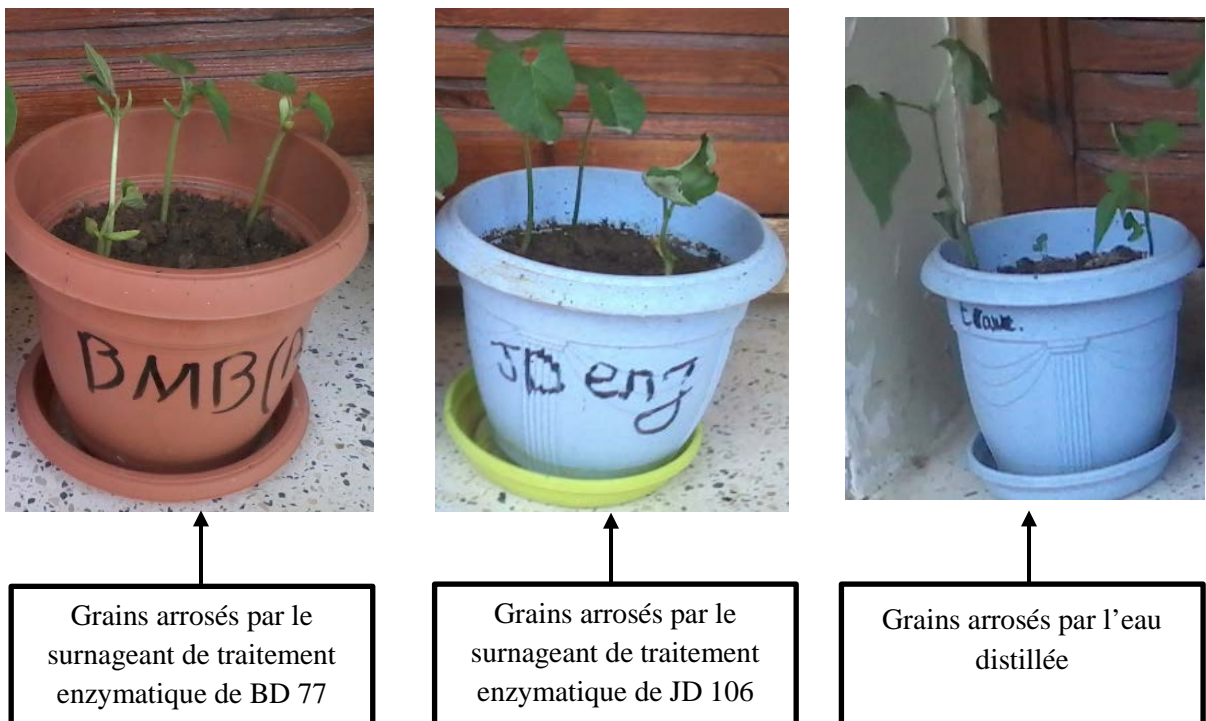
En ce qui concerne le BD 77, une haute phytotoxicité est constaté pour la solution de BD 77 et son surnageant de traitement enzymatique, tandis qu'elle réduit dans le traitement de couplage. Dans le cas de traitement Fenton seul, la solution ne présente aucune phytotoxicité.

Des résultats de la littérature effectués sur les colorants azoïques traités par procédés biologiques et enzymatiques montrent une réduction voire une élimination de la phytotoxicité [257]. Dans d'autres recherches sur la transformation des colorants azoïques par la peroxydase, rapportent une augmentation de la phytotoxicité et une réduction des longueurs des racines pour les solutions de métabolites comparées à ceux du colorant non traité [160].

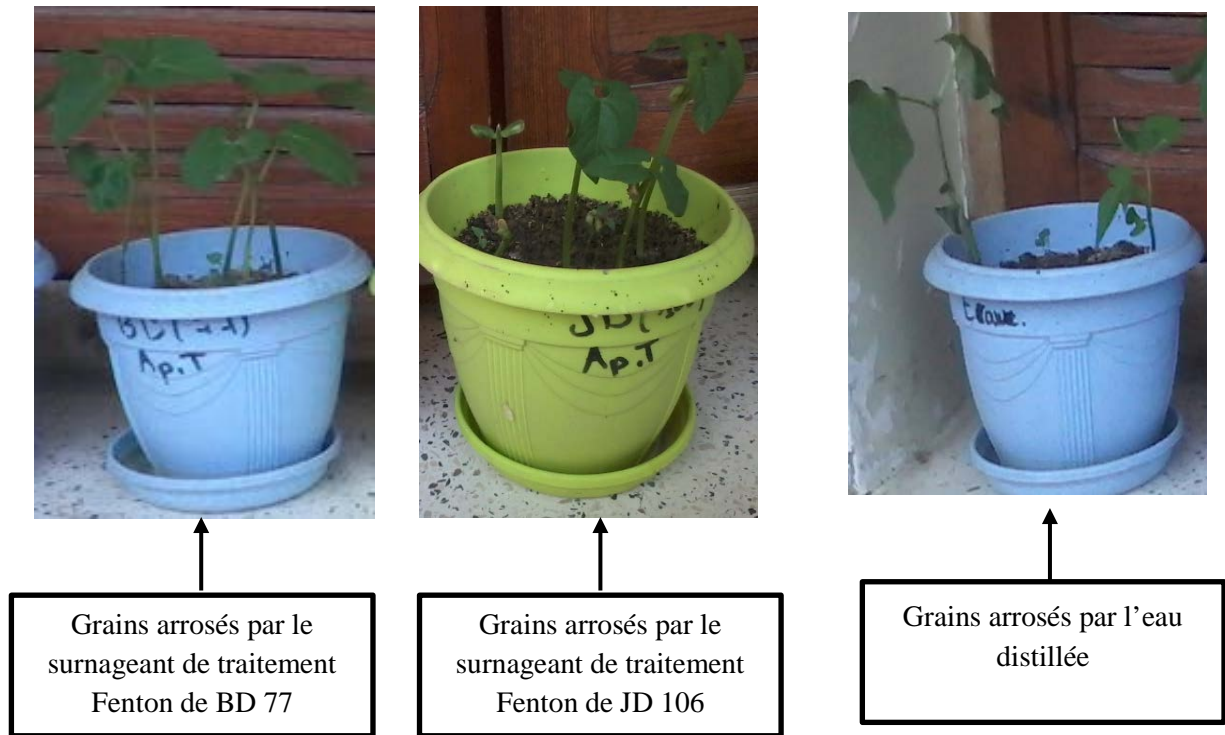
Les photos IV.3 à IV.6, présentent la germination des grains arrosés par les surnageant des différents procédés.



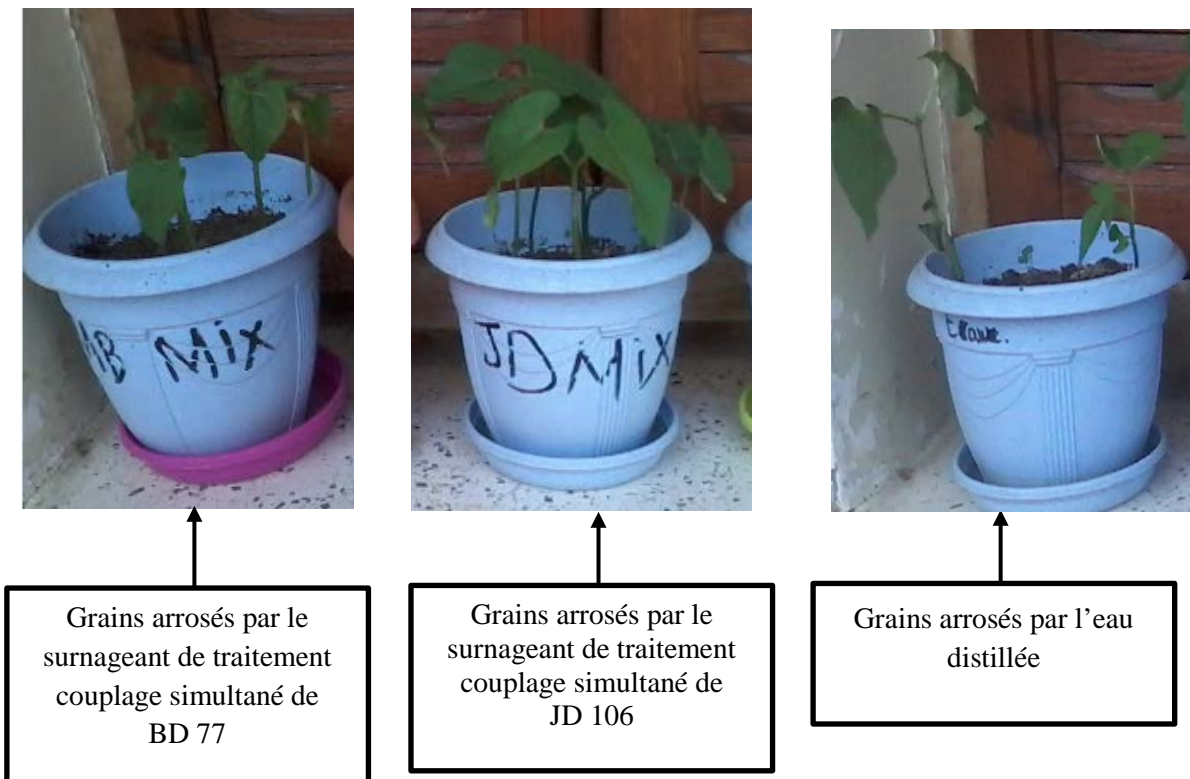
**Photos IV.3.** Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les solutions des colorants non traitées



**Photos II.4.** Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les surnageant des colorants traités par procédé enzymatique



**Photos IV.5.** Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les surnageant des colorants traités par procédé Fenton



**Photos IV.6.** Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les surnageant des colorants traités par procédés de couplage simultané

#### IV.9. Conclusion

L'étude de l'application des procédés enzymatique et chimique, a permis d'optimiser les conditions expérimentales et les différentes concentrations de colorant, de peroxyde d'hydrogène et de catalyseurs tels que l'enzyme et les cations ferreux.

Pour le traitement par la C-peroxydase, la décoloration est dépendante de la concentration de peroxyde d'hydrogène, qui devient un inhibiteur dans le cas de l'enzyme libre à partir d'une concentration critique. Cependant, l'activité de la C-peroxydase qu'elle soit libre ou immobilisée a un effet important, qui devient négligeable pour une valeur optimale.

La présence des ions métalliques peut affecter d'une manière importante ou peu importante l'AE par rapport à la nature de substrat en présence. Un résultat intéressant est celui obtenu pour les cations ferreux qui ont la propriété d'être un activateur pour les deux molécules.

L'efficacité du procédé Fenton dépend des conditions opératoires telles que le pH, la concentration des réactifs Fenton et celle de molécule organique. Cependant, un pH acide de 2 correspond à l'optimal de décoloration. La concentration de  $Fe^{2+}$  qui catalyse la réaction de génération des radicaux hydroxyle, a un effet inducteur mais jusqu'à une concentration critique où son effet devient réciproque.

Une stratégie générale pour élaborer un procédé couplé enzymatique et chimique pour le traitement des colorants a été testée. Pour cette fin, les points suivants ont été considérés : couplage séquentiel ou simultané, dosage de  $H_2O_2$ , définir la concentration optimale des catalyseurs et définir le temps de contact du procédé de couplage simultané. En effet, la détermination des RD pour un minimum de concentration de  $Fe^{2+}$  à une AE donnée, est indispensable pour la comparaison des différents couplages proposés.

Le minimum de concentrations de ce catalyseur est vérifié dans le cas de couplage simultané avec des temps de contact de 4 et 10 min pour le JD 106 et le BD 77 respectivement. Le temps et le rendement de décoloration sont plus au moins influencés dans le cas de couplage simultané avec l'enzyme immobilisée (20 et 25 min pour le JD 106 et le BD 77, respectivement).

L'analyse spectrale montre la différence qualitative entre les cinq procédés appliqués :

- Les spectres UV-visible des surnageant illustrent que tous les procédés conduisent en une absence de pic caractéristique du groupement chromophore, donc un clivage des liaisons -N=N- et >C=O.

- Les spectres IR des précipités, confirment la transformation des molécules colorantes. Dans les deux cas, la présence des cycles aromatiques est justifiée par l'absorption aux nombre d'ondes caractéristiques.
- L'analyse des chromatogrammes des solutions des colorants avant et après traitement, permettent de conclure la disparition et l'apparition de nouveaux pics.
- Suite aux résultats du test de phytotoxicité, les eaux colorées traités par le procédé Fenton et le procédé de couplage simultané peuvent être adaptés au recyclage.

# CONCLUSION GENERALE

---

Ce travail avait pour objectif l'étude de l'élimination de deux colorants, azoïque et anthraquinonique, utilisés en industrie textile, par les procédés enzymatique et chimique, en configurations individuelle ou hybride. Cette étude s'est étendue sur quatre volets : Le premier s'est axé sur la caractérisation et l'immobilisation de la peroxydase extraite de courgette. Les caractéristiques fonctionnelles de la peroxydase, jouant le rôle de biocatalyseur de la réaction de dégradation du colorant, ont été mises en évidence, à savoir, l'estimation du poids moléculaire, la stabilité, les effets de pH et de la température et la présence des effecteurs sur le pouvoir catalytique. Il a été démontré d'une part que cette peroxydase a des propriétés catalytiques conformes aux peroxydases des végétaux étudiées par plusieurs chercheurs. D'autre part, dans le but d'une mise œuvre efficace de l'enzyme, l'optimisation des concentrations d'alginate de sodium, de chlorure de calcium et de l'AE a permis de déterminer convenablement la formulation donnant une forme immobilisée stable de la C-peroxydase.

Dans le deuxième volet, une étude de décoloration de deux types de colorants a été réalisée par les deux formes, libre et immobilisée, de la peroxydase. Les résultats établis, ont montré que le rendement de décoloration par la C-peroxydase sous ses deux formes libre et immobilisée est maximal pour le JD 106 et le BD 77 à pH égale à 2 et à la température de 40°C. L'effet inhibiteur du co-substrat, le peroxyde d'hydrogène, vis-à-vis la peroxydase a permis de cibler sa concentration optimale. Dans le cas d'enzyme immobilisée, une meilleure stabilité a été notée malgré l'effet de ralentissement par les limitations diffusionnelles.

Par application du procédé Fenton, traitée dans le troisième volet, la transformation des colorants ciblés a été effectuée par l'action oxydante des radicaux  $\bullet\text{OH}$  produit dans le milieu à traiter. Ces radicaux sont produits et exercent leurs activité efficacement pour un pH de 2 et des concentrations optimales de peroxyde d'hydrogène et de colorant. Des rendements de dégradation de l'ordre de 97 % ont été atteints sous conditions optimales pour des durées de contact de 10 et de 6 minutes pour le JD 106 et le BD 77 respectivement.

Dans le but de réduire la concentration de fer utilisée et d'améliorer la qualité des rejets, pouvant contenir des sous-produits de dégradation de nature aromatique, et vu l'analogie signalée entre les deux procédés quant à la concordance qualitative et quantitative entre les paramètres opératoires, l'étude s'est orientée vers la possibilité de couplage des deux

procédés en batchs séquentiel (Enzyme-Fenton ou Fenton Enzyme) ou simultané (Enzyme/Fenton) en batch unique.

La combinaison séquentielle Fenton-enzyme a donné un rendement de plus de 98% aux concentrations de  $\text{Fe}^{2+}$  de 0.5 mM pour le JD 106 et 0.25 mM pour le BD 77. La combinaison séquentielle enzyme-Fenton, a conduit à un rendement de l'ordre de 96% et une réduction des  $\text{Fe}^{2+}$  jusqu'à 0.5 et 0.25 mM pour le JD 106 et le BD 77, respectivement.

Le couplage simultané a conduit à son tour à des rendements dépassant 98 % en utilisant des concentrations en  $\text{Fe}^{2+}$  de l'ordre de 0.125 mM.

L'analyse spectrale et par HPLC des colorants et leurs surnageant a permis de conclure que:

- Les spectres UV-vis des surnageants du JD 106 et du BD 77 issus des traitements individuels ont montré une élimination totale des groupements chromophores des deux molécules. Dans la zone de l'UV, d'autres molécules aromatiques ont été formées après action enzymatique de JD 106 et du BD 77. L'oxydation chimique par la réaction Fenton, a donné des sous-produits absorbant dans l'UV, due à l'existence des cycles aromatiques formés à partir de la molécule de JD 106. Par contre aucune molécule dans le surnageant issu du traitement du BD77 n'absorbe dans cette région.
- Les spectres des surnageants récupérés suite aux différents traitements couplés, étaient caractérisés par l'absence de l'absorption dans la région du visible, donc un clivage des groupements chromophores. Dans la zone UV, une légère absorption a été détectée, dans le cas du JD 06 traité par couplage séquentiel E-F.
- L'analyse des spectres IR des précipités récupérés et des chromatogrammes d'CLHP des surnageant issus de tous les traitements, a montré la transformation du JD106 et du BD77.

Le test de phytotoxicité nous a permis de conclure que :

- La solution du colorant BD 77 est hautement toxique alors que les surnageants des traitements de couplage et enzymatique présentent une phytotoxicité moyenne. Tandis que celui issu du traitement Fenton ne présente aucune phytotoxicité.

- La solution du colorant JD 106, est aussi hautement toxique. Les traitements individuels réduisent la phytotoxicité et elle devient non toxique après traitement par le couplage simultané.

En conclusion, la possibilité de combiner les traitements : enzymatique, par la C-peroxydase avec le Fenton, s'est avéré très efficace puisque nous sommes arrivés à atteindre des rendements de décoloration de plus de 98% avec une réduction de  $Fe^{2+}$  de plus de dix fois par rapport au procédé de Fenton seul. Par ailleurs, ce type de traitement a permis l'obtention d'une eau traitée moins toxique qui pourra être recyclée ou réutilisée.

Ainsi, pour la première fois, on a présenté les premiers résultats d'un mode de traitement innovant combinant la haute performance du procédé Fenton et la sélectivité du procédé enzymatique en symbiose par commensalisme réciproque, comme alternative à d'autres couplages présentant certaines contraintes techniques ou économiques tels que les couplages UV-Fenton, Microbien-Fenton .....

Malgré que l'objectif de ce travail a été atteint, de nombreuses perspectives de recherches peuvent être envisagées dans le futur, on pourra citer:

- Caractérisation et identification des sous – produits de dégradation dans les surnageants et dans les précipités par CG-SM ou par CLHP-SM;
- Valorisation du précipité issu de la dégradation des colorants ;
- Essais sur mélanges de colorants ou sur effluent industriel.
- Conception d'un réacteur agité ou en lit fixe pour le traitement par couplage Fenton-Enzyme, en mode discontinu ou continu ;
- Etude toxicologique sur les micro-organismes et sur les organismes supérieurs.

# Références bibliographiques

---

- [1] H. Ali, Biodegradation of Synthetic Dye, A Review, *Water, Air and Soil Pollution*, 213 (2010) 251–273
- [2] Z. Carmen, S. Daniela, Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents-A Critical Overview, *Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention-Environmental and Analytical Update*, Edition Dr. Tomasz Puzyn, (2012)55-87
- [3] K.M. Kodam, Y.M. Kolekar, Bacterial Degradation of Textile Dyes, *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters*, Environmental Science and Engineering, Springer International Publishing Switzerland (2015) 243-266
- [4] R.L. Singh, P.K. Singh, R.P. Singh, Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes : A review, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104(2015)21-31
- [5] Q. Husain, M. Husain, Peroxidases as a Potential Tool for the Decolorization and Removal of Synthetic Dyes from Polluted Water, chapter 15, *Environmental Protection strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability*, Springer Science Business Media B.V. (2012) 453-498
- [6] E. Torres, I. Bustos-Jaimes, S. Le Borgne, Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants, *Applied Catalysis B: Environmental*, 46 (2003) 1–15
- [7] Q. Husain, Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review, *Critical Review of Biotechnology*, 60(2006)201–221
- [8] Q. Husain, Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review, *Review of Environmental Science and Biotechnology*, 9 (2010) 117–140
- [9] S. Nouren, Decolorization of synthetic dyes by Citrus peroxidase, Thèse de Doctorat, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan 2014
- [10] M. Hamid, K. Rehman, Potential applications of peroxidases, *Review, Food Chemistry*, 115(2009)1177–1186
- [11] W. Hailei, L. Ping, P. Min, Z. Zhijun, Y. Guangli, L. Guosheng, Y. Jianming, Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: *Phanerochaete* sp. HSD, *Biochemical Engineering Journal*, 46(2009)327–333
- [12] K. Knutson, S. Kirzan, A. Ragauskas, Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase, *Biotechnology Letters*, 27(2005) 753–758
- [13] P. V. Nidheesh, R. Gandhimathi, S.T. Ramesh, Degradation of dyes from aqueous solution by Fenton processes: a review, *Environmental Science and Pollution Research* 20(2013)2099–2132
- [14] A. Babuponnusami, K. Muthukumar, A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(2014) 557–572
- [15] P.T. Nilesh, S. Chaudhari, Degradation of azo dyes by sequential Fenton’s oxidation and aerobic biological treatment, *Journal of Hazardous Materials*, B136(2006)698-705
- [16] I. Oller, S. Malato, J.A. Sánchez-Pérez, Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination-A review, *Science of the Total Environment*, 409 (2011) 4141–4166

- [17] M.S. Lucasa, A.A. Dias, A. Sampaio, C. Amaral, J.A. Peres, Degradation of a textile reactive Azo dye by a combined chemical-biological process: Fenton's reagent-yeast, *Water Research*, 41 (2007) 1103-1109
- [18] A. Mugdha, M. Usha, Enzymatic treatment of wastewater containing dyestuffs using different delivery systems, *Scientific review and chemical Communications*, 2(1), 2012, 31-40
- [19] J.J. Donzé, *Colorants textiles*, Techniques de l'Ingénieur, K 350(1988) p 1
- [20] M.V. Orna, Chemistry, Color, and Art, *Journal of Chemical Education*, 78(2001) 1305-1311
- [21] F. Pozzi, Development of innovative analytical procedures for the identification of organic colorants of interest in art and archaeology, Thèse de Doctorat, Université de Milano. 2010-2011
- [22] H.L. Needles, *Textile fibers, dyes, finishes, and processes*, Noyes Publications Mill Road, Park Ridge, New Jersey, USA, (1986)
- [23] R. Perrin, J.P. Scharff, *Chimie industrielle 1*, Edition MASSON, Paris(1993)
- [24] L. Singh, V.P. Singh, *Textile Dyes Degradation: A Microbial Approach for Biodegradation of Pollutants*, *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters*, Environmental Science and Engineering, Springer International Publishing Switzerland (2015) 187-204
- [25] R. Defosse, *Colorants et pigments*, Techniques de l'Ingénieur, A 3233(1991) p1
- [26] L. Pereira, M. Alves, *Dyes: Environmental Impact and Remediation*, Environmental Protection Strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability, Chapter 4, Springer Science Business Media B.V(2012)111-162
- [27] S.J. Allen, B. Koumanova, Decolourisation of water/wastewater using adsorption (review), *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40(2005)175-192
- [28] PPAH: Pollution Prevention and Abatement Handbook, Dye Manufacturing. World Bank Group (1998)298-301
- [29] J.A. Kiernan, Classification and naming of dyes, stains and fuorochromes, review, *Biotechnic and Histochemistry*, 76(5, 6) (2001) 261-277
- [30] S. Sandhya, Biodegradation of Azo Dyes Under Anaerobic Condition: Role of Azoreductase, *Biodegradation of Azo Dyes*, The Handbook of Environmental Chemistry, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 9 (2010)39-57
- [31] H.S. Freeman, G.N. Mock, *Dye Application, Manufacture of Dye Intermediates and Dyes*, Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology, Springer Science Business Media New York (2012)475-548
- [32] K. Hunger, *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*, Edition Dr. Klaus Hunger, Frankfurt, Germany (2003)
- [33] C.J. Le Coz, Dyes, in *Encyclopedia of toxicology*, 2<sup>ème</sup> edition, Elsevier, California (2005)104-114
- [34] J.S. Chang, C.Y. Lin, Decolorization kinetics of recombinant Escherichia coli strain harboring azo dye decolorization determinants for *Rhodococcus* sp, *Biotechnology Letters*, 23(2001)631-636

- [35] S. Patai, The chemistry of the hydrazo, azo and azoxy groups, Edition John Wiley and sons, Chichester, (1997)
- [36] H. Ben Mansour, O. Boughzala, D. Dridi, D. Barillier, L. Chekir-Ghedira, R. Mosrati, Les colorants textiles sources de contamination de l'eau : CRIBLAGE de la toxicité et des méthodes de traitement, Revue des Sciences de l'Eau, 24(3) (2011)209-238
- [37] H. Zollinger, Color Chemistry. Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments, 3<sup>ème</sup> Edition, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, (2003)
- [38] G. Champetier, H. Rabaté, Chimie Des Peintures, Vernis et Pigments, Paris, édition Dunod, tome II, (1955)456-476
- [39] J. Shore, Historical Development and classification of colorants and Dye structure and application properties in Colorants and auxiliaries: Organic chemistry and application properties, Vol 1: Colorants, Chapitres 1 et 3, J. Shore Edition, Society of Dyers and Colourists : Bradford, (1990)
- [40] A.A. Keck, J. Klein, M. Kudlich, A. Stolz, H.J. Knackmuss, R. Mattes, Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalene sulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. Strain BN6, Applied Environmental Microbiology, 63(1997)3684–3690
- [41] M. Chivukula, V. Renganathan, Phenolic azo-dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*, Applied Environmental Microbiology, 61(1995) 4374–4377
- [42] J.S. Chang, T.S. Kuo, Y.P. Chao, J.Y. Ho, P.J. Lin, 'Azo Dye Decolorization with a Mutant *Escherichia coli* Strain, Biotechnology Letters, 22(2000) 807-812
- [43] F.P. Van der Zee, S. Villaverde, Combined Anaerobic-Aerobic Treatment of Azo Dyes-A Short Review of Bioreactor Studies, Water Research, 39(8) (2005) 1425-1440
- [44] A. Pandey, P. Singh, L. Iyengar, Review Bacterial decolorization and degradation of azo dyes, International Biodeterioration and Biodegradation, 59(2007) 73–84
- [45] M. Kudlich, A. Keck, J. Klein, A. Stolz, Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo-dye reduction, Applied Environmental Microbiology, 63 (1997)3691-3694
- [46] T. Zimmermann, F. Gasser, H.G. Kulla, T. Leisinger, Comparison of two bacterial azoreductases acquired during adaptation to growth on azo dyes, Archives of Microbiology, 138(1984)37-43
- [47] Y. Anjaneyulu, N.S. Chary, D. S. Suman Raj, Decolourization of industrial effluents - available methods and emerging technologies, a review, Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 4(2005)245–273
- [48] A. Paszczynski, R.L. Crawford, Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol, Biochemical and Biophysical Research Communication, 178(3) (1991) 1056-1063
- [49] S. Goszczynski, A. Paszczynski, M.G. Pasti-Grigsby, R.L. Crawford, New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*, Journal of Bacteriology, 176(1994)1339–1347
- [50] D.C. Kalyani, S.S. Phugare, U.U. Shedbalkar, P. Jadhav, Purification and characterization of a bacterial peroxidase from the isolated strain *Pseudomonas* sp.SUK1

and its application for textile dye decolorization, *Annals of Microbiology*, 61(2011)483–491

[51] V.V. Dawkar, U.U. Jadhav, A. A. Telke, S.P. Govindwar, Peroxidase from *Bacillus sp.* VUS and Its Role in the Decolorization of Textile Dyes, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(2009)361-368

[52] J.T. Spadaro, V. Renganathan, Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of Disperse Yellow 3 degradation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312 (1994)301–307

[53] G.K. Parshetti, A.A. Telke, D.C. Kalyani, S.P. Govindwar, Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye methyl orange by *Kocuria rosea* MTCC 1532, *Journal of Hazardous Materials*, 176 (2010)503–509

[54] R. Khan, P. Bhawana, M.H. Fulekar, Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review, *Review of Environmental Science Biotechnology*, 12(2013)75–97

[55] J.R. Aspland, Textile dyeing and coloration, Research Triangle Park: American Association of Textile, Chemists and Colorists (1997)

[56] G.L. Baughman, E.J. Weber, Transformation of dyes and related-compounds in anoxic sediment kinetics and products, *Environmental Science & Technology*, 28(1994)267–276

[57] M.A. Gouda, M.A. Berghot, A. Shoeib, K.M. Elattar, A.M. Khalil, Chemistry of 2-aminoanthraquinones, *Turkish Journal of Chemistry*, 34(2010)651–709

[58] S.M. Eremenko, B.Y. Dain, The nature of the active states during photochemical reactions of anthraquinone dyes with alcohols, *Theoretical and Experimental Chemistry*, 2(6) (1966)560-562

[59] L. Jia-le, L. Han-jin, W. Chao-hai, Degradation of anthraquinone dyes by ozone, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 17(2007) 880-886

[60] L. Liu, J. Zhang, Y. Tan, Y. Jiang, M. Hu, S. Li, Q. Zhai, Rapid decolorization of anthraquinone and triphenylmethane dye using chloroperoxidase: Catalytic mechanism, analysis of products and degradation route, *Chemical Engineering Journal*, 244 (2014)9–18

[61] S. Andleeb, N. Atiq, A. Parmar, G.D. Robson, S. Ahmed, An HPLC method development for the assessment of degradation products of anthraquinone dye, *Environmental Monitoring and Assessment*, 176(2011)597–604

[62] S.N. Singh, S. Mishra, N. Jauhari, Degradation of anthraquinone Dyes Stimulated by Fungi, *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters*, Environmental Science and Engineering, Springer International Publishing Switzerland, (2015)333-352

[63] N. Hidalgo, G. Mangiameli, T. Manzano, G.G. Zhadan, J.F. Kennedy, V.L. Shnyrov, M.G. Roig, Oxidation and Removal of Industrial Textile Dyes by a Novel Peroxidase Extracted from Post-harvest Lentil (*Lens culinaris* L.) Stubble, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(2011)821-829

[64] T. Hadibarata, A.R.M. Yusoff, R.A. Kristanti, Decolorization and Metabolism of Anthraquinone-Type Dye by Laccase of White-Rot Fungi *Polyporus sp.* S133, *Water Air and Soil Pollution*, 223 (2012) 933–941

[65] H. Xu, T.M. Heinze, S. Chen, C.E. Cerniglia, H. Chen, Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes (Sudan dyes) by human intestinal microflora, *Applied Environmental Microbiology*, 73(2007)7759-7762

- [66] H. Ollgaard, L. Frost, J. Galster, O.C. Hansen, Survey of azo-colorants in Denmark: Consumption, use, health and environmental Aspects, Danish Technological Institute, Environment, Danish Environmental Protection Agency, November, (1998)
- [67] R.O. Alves de Lima, A.P. Bazo, D.M. F. Salvadori, C.M. Rech, D. de Palma Oliveira, G. de Aragao Umbuzeiro, Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source, *Mutation Research*, (2007) 626 53–60
- [68] A. Gottlieb, C. Shaw, A. Smith, A. Wheatley, S. Forsythe, The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation, *Journal of Biotechnology*, 101(2003) 49-56
- [69] M.K. Sharma, R.C. Sobti, Rec effect of certain textile dyes in *Bacillus subtilis*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 465(1) (2000) 27-38
- [70] Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System, azobenzene, US National library of Medicine CASRN 103-33-3 (1987)
- [71] K.T. Chung, C.E. Cerniglia, Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 277 (1992) 201-220
- [72] R. Jung, D. Steinle, R. Anliker, A compilation of genotoxicity and carcinogenicity data on aromatic aminosulphonic acids, *Food Chemistry and Toxicology*, 30 (1992)635-660
- [73] I.M. Banat, P. Nigam, D. Singh, R. Machant, Microbial decolorization of textile dye containing effluent, A review, *Bioresource Technology*, 58(1996)217–227
- [74] H. Desoille, J. Scherrer, R. Truhauter, *Précis de médecine du travail*, 5<sup>ème</sup> Edition Masson, (1987)838-845
- [75] K. Itoh, C. Kitade, C. Yatome, A pathway for biodegradation of an anthraquinone dye, C.I disperse red 15, by a yeast strain *Pichia anomala*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56 (3) (1996)413–418
- [76] IARAC Monographs, Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking water, World Health Organization, Lyon, France, 101(2011) 41-70
- [77] J.P. Brown, A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 75(1980)243-277
- [78] J.P. Brown, R.J. Brown, Mutagenesis by 9,10-anthraquinone derivatives and related compounds in *Salmonella typhimurium*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 40(1976)203-224
- [79] R.C. Kuhad, R. Gupta, Y. Pal Khasa, Microbial Decolorization of Colored Industrial Effluents, Chapter 35. *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*, Springer Science Business Media B.V. (2012) 787-813
- [80] F.M. Drumond Chequer, G.A.R. de Oliveira, E.R. Anastácio Ferraz, J.C. Cardoso, M.V.B. Zanoni, D.P. de Oliveira, *Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact*, Chapter 6. *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*, (2013)151-176
- [81] Ratna, B.S. Padhi, Pollution due to synthetic dyes toxicity & carcinogenicity studies and remediation, *International Journal of Environmental Sciences*, 3(3) (2012) 940-955

- [82] C. Torres-Duarte, R. Vazquez-Duhalt, Applications and Prospective of Peroxidase Biocatalysis in the Environmental Field, Chapter 8, Biocatalysis Based on Heme Peroxidases, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2010)179-206
- [83] Journal Officiel de La République Algérienne N° 26 23, Décret exécutif n° 06-141 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels, du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 avril (2006)
- [84] l'Industrie textile : Prévention de la pollution dans la région méditerranéenne, Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre (CAR/PP), septembre (2002) 29-31
- [85] Y.M. Slokar, A.M. Le Marechal, Methods of Decoloration of Textile Wastewaters, Dyes and Pigments, 37(4)(1998)335-356
- [86] T. Robinson, G. McMullan, R. Marchant, P. Nigam, Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, Bioresources Technology, 77(2001)247–255
- [87] E. Forgacs, T. Cserhati, G. Oros, Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, Environment International, 30(2004) 953– 971
- [88] P. Monash, G. Pugazhenti, Adsorption of crystal violet dye from aqueous solution using mesoporous materials synthesized at room temperature, Adsorption, 15(2009)390–405
- [89] P. Nigam, G. Armour, I.M. Banat, D. Singh, R. Marchant, Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. Bioresource Technology, 72 (2000) 219-226
- [90] J.R. Easton, The dye maker's view, in Colour in dyehouse effluent, Edition P. Cooper, Society of Dyers and Colourists: Bradford, England, (1995)9-21
- [91] M.F.R. Pereira, S.F. Soares, J.J.M. Orfão, J.L. Figueiredo, Adsorption of dyes on activated carbons: influence of surface chemical groups. Carbon, 41(2003)811–821
- [92] T. Robinson, B. Chandran, P. Nigam, Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw, Water Research, 36(2002)2824–2830
- [93] S.D. Lambert, N.J.D. Graham, C.J. Sollars, G.D. Fowler, Evaluation of inorganic adsorbents for the removal of problematic textile dyes and pesticides. Water Science and Technology, 36 (1997) 173-180
- [94] G. McKay, G. Ramprasad, P. Mowli, Desorption and regeneration of dye colours from low-cost materials. Water Research, 21(3) (1987) 375-377
- [95] Z. Wang, M. Xue, K. Huang, Z. Liu, Textile Dyeing Wastewater Treatment. Advances in Treating Textile Effluent, Edition Prof. Peter Hauser, InTech (2011) 91-116
- [96] C.N. Chang, J.G. Lin, A.C. Chao, C.S. Liu, Modified Nernst model for on-line control of the chemical oxidation decoloring process, Water Science Technology, 34 (1996)151–157
- [97] P.P. Vijaya, S. Sandhya, Decolorization and Complete Degradation of Methyl Red by a Mixed Culture, The Environmentalist, 23 (2003)145–149
- [98] H. Chen, Recent Advances in Azo Dye Degrading Enzyme Research, Current Protein and Peptide Science, 7 (2006) 101-111
- [99] M. Solis, A. Solis, H.I. Perez, N. Manjarrez, M. Flores, Microbial decolouration of azo dyes: A review. Process Biochemistry, 47 (2011)1723–1748

- [100] C.I. Pearce, JR. Lloyd, JT. Guthrie, The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review, *Dyes and Pigments*, 58 (2003)179–196
- [101] C. Seignez, N. Adler, J.C. Suard, P. Peringer, Aerobic and anaerobic biodegradability of 1-antraquinone sulphonate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1996)719-722
- [102] G.M. Walker, L. R. Weatherley, Biodegradation and biosorption of acid anthraquinone dye, *Environmental Pollution*, 108 (2000) 219-223
- [103] S.R. Couto, Dye removal by immobilised fungi, *Biotechnology Advanced*, 27(2009)227–235
- [104] H-R. K-Hamedaani, A. Sakurai, M. Sakakibara, Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus, *Dyes and Pigments*, 72(2007)157-162
- [105] S.B. Pointing, Feasibility of bioremediation by white-rot fungi, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (2001) 20-33
- [106] A.D. Albino, A. Sampaio, R.M. Bezerra, Environmental Applications of Fungal and Plant Systems: Decolourisation of Textile Wastewater and Related Dyestuffs. *Environmental Bioremediation Technologies*, chapitre 19 (2007)445-463
- [107] Y. Sugano, Y. Matsushima, K. Tsuchiya, H. Aoki, M. Hirai, M. Shoda, Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec1. *Biodegradation*, 20(2009)433-440
- [108] Y. Sugano, Y. Matsushima, M. Shoda, Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(2006)862–871
- [109] J.Q. Liu, H.T. Liu, Degradation of azo dyes by algae, *Environmental Pollution*, 75 (1992)273–278
- [110] J. Swamy, J.A. Ramsay, The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes, *Enzyme and Microbial Technology*, 24 (1999)130–137
- [111] L. Gianfreda, M .A. Rao, Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review, *Enzyme Microbiology Technology*, 35(2004)339–354
- [112] C. Held, A. Kandelbauer, M. Schroeder, A. Cavaco-Paulo, G.M. Guebitz, Biotransformation of phenolics with laccase containing bacterial spores, *Environmental Chemical Letters*, 3(2005)74–77
- [113] S. Sumathi, B.S. Manju, Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*, *Enzyme Microbiology Technology*, 27(2000)347–355
- [114] S. R. Couto, Enzymatic biotransformation of synthetic dyes, *Current Drug Metabolism*, 10(9) (2009)1048–1054
- [115] F. Xu, Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials ace well ace halide inhibition, *Biochemistry*, 35(1996)7608-7614
- [116] S. R. Couto, J. L.T. Herrera, Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnology Advances*, 24(2006) 500–513
- [117] A.M. Mayer, R.C. Staples, Laccase: new functions for an old enzyme, review, *Phytochemistry*, 60 (2002)551–565

- [118] X.Q. Yang, X.X. Zhao, C.Y. Liu, Y. Zheng, S.J. Qian, Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase, *Process Biochemistry*, 44 (2009)1185–1189
- [119] M. Hofrichter, R. Ullrich, M.J. Pecyna, C. Liers, T. Lundell, New and classic families of secreted fungal heme peroxidases, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2010) 871–897
- [120] G. Battistuzzi, M. Bellei, C.A. Bortolotti, M. Sola, Redox properties of heme peroxidases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1) (2010) 21–36
- [121] W. Adam, M. Lazarus, C.R. Saha-Moller, O. Weichold, U. Hoch, D. Haring, P. Schreier, Biotransformations with Peroxidases, *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 63(1999)73-108
- [122] N.C. Veitch, Structural determinants of plant peroxidase function, *Phytochemistry Reviews*, 3(2004)3–18
- [123] B.R.V. Huystee, G.M. Roig, L.V. Shnyrov, I.Y. Sakharov, Peroxidase stability related to its calcium and glycans, *Phytochemistry Reviews*, 3(2004)19–28
- [124] N.C. Veitch, Molecules of interest: Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, 65 (2004) 249–259
- [125] K. Yoshida, P. Kaothien, T. Matsui, A. Kawaoka, A. Shinmyo, Molecular biology and application of plant peroxidase genes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 (2003) 665–670
- [126] V.G. Grigorenko, I.P. Andreeva, M.Y. Rubtsova, A.M. Egorov, Recombinant Horseradish Peroxidase: Production and Analytical Applications, *Biochemistry (Moscow)*, 80(4) (2015) 408-416
- [127] S. Asad, B. Dabirmanesh, N. Ghaemi, S.M. Etezzad, K. Khajeh, Studies on the Refolding Process of Recombinant Horseradish Peroxidase, *Molecular Biotechnology*, 54(2013)484–492
- [128] S.M.A.G.U. de Souza, E. Forgiarini, A.A.U. de Souza, Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP), *Journal of Hazardous Materials*, 147(2007)1073–1078
- [129] P.R.O. de Montellano, Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases, Chapter 5, *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010) 79-102
- [130] G.S. Zakharova, I.V. Uporov, V.I. Tishkov, Horseradish Peroxidase: Modulation of Properties by Chemical Modification of Protein and Heme, review, *Biochemistry (Moscow)*, 76(13) (2011)1391-1401
- [131] V.A. Cooper, J.A. Nicell, Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase, *Water Research*, 30 (4)(1996)954-964
- [132] M. Matto, Q. Husain, Decolorization of direct dyes by immobilized turnip peroxidase in batch and continuous processes, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2009)965–971
- [133] R. Satar, Q. Husain, Use of Bitter Gourd (*Momordica charantia*) Peroxidase Together with Redox Mediators to Decolorize Disperse Dyes, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(2009)213-219

- [134] A. Bhunia, S. Durani, P.P. Wangikar, Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes, *Biotechnology and Bioengineering*, 72 (2001)562–567
- [135] Z. Karim, Q. Husain, Redox-mediated oxidation and removal of aromatic amines from polluted water by partially purified bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63 (2009)587–593
- [136] T.S. Shaffiq, J. Jegan Roy, R. Aswathinair, T. Emilia Abraham, Degradation of Textile Dyes Mediated by Plant Peroxidases, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (102-103) (2002)315-326
- [137] H. Jouili, H. Bouazizi, E. El Ferjani, Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress, review, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33 (2011) 2075–2082
- [138] E.A. Erkurt, H.A. Erkurt, A. Unyayar, Decolorization of Azo Dyes by White Rot Fungi. *Biodegradation of Azo Dyes*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010)157-167
- [139] N. Durán, E. Esposito, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, *Applied Catalysis B: Environmental*, 28 (2000) 83–99
- [140] M.T. Moreira, C. Palma, I. Mielgo, G. Feijoo, J.M. Lema, In vitro degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase, *Biotechnology and Bioengineering*, 75(2001)362–368
- [141] R.G. Saratale, G.D. Saratale, J.S. Chang, S.P. Govindwar, Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42 (2011)138–157
- [142] Y. Sugano, R. Nakano, K. Sasaki, M. Shoda, Efficient heterologous expression in *Aspergillus oryzae* of a unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1, *Applied Environmental Microbiology*, 66(2000)1754–1758
- [143] M. Matto, Q. Husain, Redox mediated decolorization of Direct Red 23 and Direct Blue 80 catalyzed by bioaffinity based immobilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) peroxidases, *Biotechnology Journal*, 3(8) (2008)1224–1231
- [144] J.A. Nicell, J.K. Bewtra, N. Biswas, E. Taylor, Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater, *Water Research*, 27(1993) 1629–1639
- [145] S.V. Mohan, K.K. Prasad, N.C. Rao, P.N. Sarma, Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase catalyzed process, *Chemosphere*, 58(2005)1097–1105
- [146] V.L. Maddhinni, H.B. Vurimindi, A. Yerramilli, Degradation of azo dye with horseradish peroxidase (HRP), *Journal Indian Institute of Science*, 86(2006)507–514
- [147] J. Shim, G.Y. Kim, K.H. Yeon, S.H. Cho, J.J. Woo, S.H. Moon, Degradation of azo dye by an electroenzymatic method using horseradish peroxidase immobilized on porous support, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(2007)72–78
- [148] F. Gholami-Borujeni, A.H. Mahvi, S. Nasserri, M.A. Faramarzi, R. Nabizadeh, M. Alimohammadi, Enzymatic Treatment and Detoxification of Acid Orange 7 from Textile Wastewater, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2011)1274–1284
- [149] S. Onder, M. Celebi, M. Altikatoglu, A. Hatipoglu, H. Kuzu, Decolorization of Naphthol Blue Black using the Horseradish Peroxidase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(2011)433–443

- [150] M. Matto, Q. Husain, Decolorization of direct dyes by salt fractionated turnip proteins enhanced in the presence of hydrogen peroxide and redox mediators, *Chemosphere*, 69(2007) 338–345
- [151] Y. Kulshrestha, Q. Husain, Decolorization and degradation of acid dyes mediated by partially purified turnip (*Brassica rapa*) peroxidase, *Toxicology and Environmental Chemistry*, 89(2007)255–267
- [152] S. Akhtar, A. Ali Khan, Q. Husain, Partially purified bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes, *Bioresource Technology*, 96(2005)1804–1811
- [153] S. Akhtar, A. Ali. Khan, Q. Husain, Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent, *Chemosphere*, 60(2005)291–301
- [154] M. Matto, Q. Husain, Decolorization of textile effluent by bitter gourd peroxidase immobilized on concanavalin A layered calcium alginate–starch beads, *Journal of Hazardous Materials*, 164 (2009) 1540–1546
- [155] M. Matto, R. Satar, Q. Husain, Application of calcium alginate–starch entrapped bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase for the removal of colored compounds from a textile effluent in batch as well as in continuous reactor, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158(2009)512-523
- [156] R. Satar, Q. Husain, Catalyzed degradation of disperse dyes by calcium alginate-pectin entrapped bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase, *Journal of Environmental Sciences*, 23(7) (2011)1135–1142
- [157] F. Jamal, T. Qidwai, P.K. Pandey, D. Singh, Catalytic potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) bud peroxidase in decolorization of synthetic recalcitrant dyes using redox mediator, *Catalysis Communications*, 15 (2011) 93–98
- [158] M. Morita, R. Ito, T. Kamidate, H. Watanabe, Kinetics of peroxidase catalyzed decolorisation of Orange II with hydrogen peroxide, *Textile Research Journal*, 66(7) 470-473(1996)
- [159] M.C. Silva, J.A. Torres, L.R.V. de Sa, P.M.B. Chagas, V.S. Ferreira-Leitao, A.D. Corrêa, The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 89 (2013) 122– 129
- [160] M. Reihmann, H. Ritter, Synthesis of Phenol Polymers Using Peroxidases, *Advanced in Polymer Science*, 194(2006)1–49
- [161] M. Wagner, J.A. Nicell, Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide, *Water Research*, 36(2002)4041–4052
- [162] Z. Tong, Z. Qingxiang, H. Hui, L. Qin, Z. Yi, Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from wastewater by horse radish peroxidase, *Chemosphere*, 34(4) (1997)893-903
- [163] S. Dalal, M. Nath Gupta, Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering, *Chemosphere*, 67(2007)741–747
- [164] S. Akhtar, Q. Husain, Potential applications of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water, *Chemosphere*, 65(2006) 1228–1235

- [165] C. Regalado, B.E. Garcia-Almendarez, M.A. Duarte-Vázquez, Biotechnological applications of peroxidases, *Phytochemistry Reviews* 3 (2004)243–256
- [166] L. Casella, E. Monzani, S. Nicolis, Potential Applications of Peroxidases in the Fine Chemical Industries Chapter 6, *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010)111-153
- [167] M. Matto, Q. Husain, Calcium alginate–starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(2009)164–170
- [168] I. Eş, J.D. Gonçalves, Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2015)2065–2082
- [169] A. Longoria, R. Tinoco, E. Torres, Enzyme Technology of Peroxidases: Immobilization, Chemical and Genetic Modification, Chapter 9, *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010)209-243
- [170] M.M.M. Elnashar, The Art of Immobilization using Biopolymers, Biomaterials and Nanobiotechnology, *Biotechnology of Biopolymers*, Edition Prof. Magdy Elnashar, (2011)
- [171] P. Zucca, E. Sanjust, Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms, Review, *Molecules*, 19 (9)(2014)14139-14194a (1987)347-404
- [172] S.A. Mohamed, A.S. Aly, T.M. Mohamed, H.A. Salah, Immobilization of Horseradish Peroxidase on Nonwoven Polyester Fabric Coated with Chitosan, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144 (2008) 169–179
- [173] F. Jamal, S. Singh, T. Qidwai, D. Singh P.K. Pandey, G.C. Pandey, M.Y. Khan, Catalytic activity of soluble versus immobilized cauliflower (*Brassica oleracea*) bud peroxidase-concanavalin A complex and its application in dye color removal, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(2013)311–321
- [174] M. Celebi, M.A. Kaya, M. Altikatoglu, H. Yildirim, Enzymatic Decolorization of Anthraquinone and Diazo Dyes Using Horseradish Peroxidase Enzyme Immobilized onto Various Polysulfone Supports, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2013) 716-730
- [175] G. Bayramoglu, B. Altintas, M.Y. Arica, Cross-linking of horseradish peroxidase adsorbed on polycationic films: utilization for direct dye degradation, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35 (2012) 1355–1365
- [176] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, Understanding enzyme immobilization, *Chemical Society Reviews*, 38(2009) 453-468
- [177] E. Benešová, B. Králová, Affinity Interactions as a Tool for Protein Immobilization, *Affinity Chromatography*. Edition Dr. Sameh Magdeldin, *InTech*(2012)29-46
- [178] F.G. Borujeni, A.H. Mahvi, S. Naseri, M.A. Faramarzi, R. Nabizadeh, M. Alimohammadi, Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution, *Research Journal of Chemistry and Environment*, 15 (2) (2011) 217-222
- [179] I. Alemzadeh, S. Nejati, Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase, *Journal of Hazardous Materials*, 166(2009)1082–1086

- [180] F.Q. Guerrero, M.A. Duarte-Vazquez, B.E. Garcia-Almendarez, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, C. Regalado, Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 8605–8611
- [181] K. Enayatzamir, H.A. Alikhani, B. Yakhchali, F. Tabandeh, S. Rodriguez-Couto, Decoloration of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized into alginate beads, *Environmental Science and Pollution Research International*, 17(1)(2010) 145-153
- [182] S. Karthikeyan, A. Titus, A. Gnanamani, A.B. Mandal, G. Sekaran, Treatment of textile wastewater by homogeneous and heterogeneous Fenton oxidation processes, *Desalination*, 281(2011)438–445
- [183] E.J. Land, M. Ebert, Pulse radiolysis studies of aqueous phenol, water elimination from dihydroxycyclohexadienyl radicals to form phenoxyl, *Transaction of the Faraday Society*, 63(1967)1181-1190
- [184] D. Hermosilla, N. Merayo, A. Gascó, Á. Blanco, The application of advanced oxidation technologies to the treatment of effluents from the pulp and paper industry: a review, *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2015)168–191
- [185] M.C. Edelahi, Contribution à l'étude de dégradation in situ des pesticides par procédés d'oxydation avancée faisant intervenir le fer. Application aux herbicides phénylurées, Thèse de Doctorat, Université de Marne-La-Vallée(2004)
- [186] N.N. Mahamuni, Y.G. Adewuyi, Advanced oxidation processes (AOPs) involving ultrasound for waste water treatment: A review with emphasis on cost estimation, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(2010)990–1003
- [187] L.L. Moisee, Oxidation methods in the technology for water and air cleaning (based on the materials of the First international Conference on Advanced Oxidation Technologies for Water and Air Remediation, *Russian Chemical Bulletin*, 44 (3) (1995)560-572
- [188] J.O. Tijani, O.O. Fatoba, G. Madzivire, L.F. Petrik, A Review of Combined Advanced Oxidation Technologies for the Removal of Organic Pollutants from Water, *Water Air and Soil Pollution*, 225(2102) (2014) 1-30
- [189] G. López-Cueto, M. Ostra, C. Ubide, J. Zuriarrain, Fenton's reagent for kinetic determinations, *Analytica Chimica Acta*, 515(2004)109–116
- [190] H. Chenini, Etude de la degradation par voie photochimique de polluant organique "Orange G" en milieu aqueux homogène et hétérogène, Thèse de Doctorat, Université Mentouri, Constantine (2013)
- [191] J. De Laat, G.T. Le, B. Legube, A comparative study of the effects of chloride, sulphate and nitrate ions on the rates of decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic compounds by Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Chemosphere*, 55(2004)715–723
- [192] K. Barbusinski, Fenton reaction controversy concerning the chemistry, *Ecological Chemistry and Engineering*, 16(3)(2009)347-358
- [193] H. Gallard, T. De Laat, Kinetics of oxidation of chlorobenzenes and phenyl-ureas by Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Chemosphere*, 42(2001)405–413
- [194] A.M. Guedes, L.M. Madeira, R.A. Boaventura, C.A. Costa, Fenton oxidation of cork cooking wastewater-overall kinetic analysis, *Water Research*, 37 (2003) 3061–3069
- [195] S. Wang, A comparative study of Fenton and Fenton-like reaction kinetics in decolourisation of wastewater, *Dyes Pigments*, 76(2008)714–720

- [196] J.H. Sun, S.P. Sun, G.L. Wang, L.P. Qiao, Degradation of azo dye Amido black 10B in aqueous solution by Fenton oxidation process, *Dyes and Pigments*, 74 (2007) 647-652
- [197] K.V. Padoley, S.N. Mudliar, S.K. Banerjee, S.C. Deshmukh, R.A. Pandey, Fenton oxidation: A pretreatment option for improved biological treatment of pyridine and 3-cyanopyridine plant wastewater, *Chemical Engineering Journal*, 166 (2011) 1–9
- [198] I.A. Alaton, B.H. Gursoy, J. E. Schmidt, Advanced oxidation of acid and reactive dyes: Effect of Fenton treatment on aerobic, anoxic and anaerobic processes, *Dyes and Pigments*, 78(2008)117-130
- [199] S. Karimi, A. Abdulkhani, A.H.B. Ghazali, F-Razi Ahmadun, A. Karimi, Color remediation of chemimechanical pulping effluent using combination of enzymatic treatment and Fenton reaction, *Desalination*, 249 (2009) 870–877
- [200] M. Chhabra, S. Mishra, T.R. Sreekrishnan, Combination of chemical and enzymatic treatment for efficient decolorization/degradation of textile effluent: High operational stability of the continuous process, *Biochemical Engineering Journal*, 93(2015)17–24
- [201] M.R. Ghezzar, M. Belhadj, F. Abdelmalek, A. Rais, A. Addou, Degradation of wastewater by gliding arc discharge, *International of Environment and Waste Management*, 2(2008)458-470
- [202] G. Walsh, *protein biotechnology and biochemistry*, Edition John Wiley and Sons, (2002)
- [203] S. Simsek, A. Yemencioğlu, Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenol oxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms, *Process Biochemistry*, 42(6) (2007)943–950
- [204] J.A. Nicell, H. Wright, A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide, *Enzyme and Microbial Technology*, 21(4)(1997), 302–310
- [205] J-Z. Liu, T-L. Wang, L-N, Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 41 (2006) 81–86
- [206] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2)(1976) 248–254
- [207] C. Nigma, I-F. Tsao, A. Sakoda, H.Y. Wang, Techniques for preparing hydrogel membrane capsules, *Biotechnology Techniques*, 2(4) (1988) 271–276
- [208] Y. Yucel, C. Demir, N. Dizge, B. Keskinler, Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase, *Biomass and Bioenergy*, 35(4)(2011)1496–1501
- [209] A. Cornish-Bowden, M. Jamin, V. Saks, *Cinétique enzymatique*, Collection Grenoble Sciences, Portland Press, Ltd. London, (2004)
- [210] J.F. Rivas, J.F. Beltran, O. Gimeno, J. Frades, treatment of olive oil mill wastewater by Fenton's reagent, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 1873-1880
- [211] P.R. Warman, Evaluation of seed germination and growth tests for assessing compost maturity, *Compost Science and Utilization*, 7(1999) 33–37
- [212] AFNOR X31-201, *Qualité des sols : essai d'inhibition de germination de semences par une substance*, (1982) p5

- [213] ISO 11269-2, Qualité du sol – Détermination des effets des polluants sur la flore du sol partie 2 : effets des substances chimiques sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs, (1995) p10
- [214] C.G. Boer, L. Obici, C.G. M. de Souza, R. M. Peralta, Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*, *Process Biochemistry* 41 (2006) 1203–1207
- [215] E. Clemente, Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges, *Phytochemistry*, 49(1998)29–36
- [216] A. Rompel, M. Albers, J.I. Naseri, C. Gerdemann, K. Büldt-Karentzopoulos, B. Jasper, B. Krebs, Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774 (2007) 1422–1430
- [217] C. Hu, R. Smith, R.B.V. Huystee, Biosynthesis and localization of peanut peroxidases, *Journal of Plant Physiology*, 135(1989) 391–397
- [218] D. Lopez-Molina, H.A. Heering, G. Smulevich, J. Tudela, R.N.F. Thorneley, F. Garcia-Canovasa, J.N. Rodriguez-Lopez, Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L, *Journal of Inorganic Biochemistry* 94 (2003) 243–254
- [219] M.A. Duarte-Vazquez, J.R. Whitaker, A. Rojo-Dominguez, B.E. Garcia-Almendarez, C. Regalado, isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 5096–5102
- [220] L. Casella, M. Gullottit, S. Polit, R.P. Ferrari, E. Laurenti, Augusto Marchesini, Purification, characterization and catalytic activity of anionic zucchini peroxidase, *BioMetals*, 6(1993)213-222
- [221] D.S. Robinson, Peroxidase and catalase, In : *Oxidative enzymes in foods*, Editions D. S. Robinson et N. A. M. Eskin, New York, Elsevier applied Science (1991)1–49
- [222] A. Fatima, Q. Husain, R.H. Khan, A peroxidase from bitter melon (*Momordica charantia*) with enhanced stability against organic solvent and detergent: A comparison with horseradish peroxidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 47 (2007) 66–71
- [223] S.A. Mohamed, K.O. Abulnaja, A.S. Ads, J.A. Khan, A.T. Kumosani, Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady, *Food Chemistry* 128 (2011) 725–730
- [224] L. Casella, M. Gullottit, S. Polit, R.P. Ferrari, E. Laurenti, A. Marchesini, Purification, characterization and catalytic activity of anionic zucchini peroxidase, *BioMetals*, 6 (1993)213-222
- [225] S. De Leonadis, N. Dipierro, S. Dipierro, Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria, *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (2000) 773–779
- [226] A.M. Al-Senaidy, M.A. Ismael, Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.), *Saudi Journal of Biological Sciences* (2011) 18, 293–298
- [227] C.M. Ajila, U.J.S. PrasadaRao, Purification and characterization of black gram (*Vignamungo*) husk peroxidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60 (2009)36–44

- [228] P.V. Pandey, N.U. Dwivedi, Purification and characterization of peroxidase from *Leucaenaleucocephala*, a tree legume, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68 (2011) 168–173
- [229] S. Shah, D. Borah, R.N.S. Yadav, Extraction and characterization of peroxidase from *Camellia sinensis*, *Proceeding of the National Academy of Science, India, Section B: Biological Science*, 84(2) (2014)343–348
- [230] K. Szigeti, L. Smeller, S. Osvath, Z. Majer, J. Fidy. The structure of horseradish peroxidase C characterized as a molten globule state after  $C^{2+}$  depletion, *Biochemica and Biophysica Acta*,12(2008)1965-74
- [231] U. Kalsoom, H.N. Bhatti, M. Asgher, Characterization of Plant Peroxidases and Their Potential for Degradation of Dyes: a Review, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176 (2015)1529–1550
- [232] Z. Knezevic, S. Bobic, A. Milutinovic, B.Obradovic, L. Mojovic, B.Bugarski, Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system, *Process Biochemistry* 38 (2002) 313-318
- [233] B. Cheirsilp, P. Jeamjounkhaw, A. H-Kittikun, Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59 (2009) 206–211
- [234] H.M.N. Iqbal, M. Asgher, Decolorization applicability of sol–gel matrix immobilized manganese peroxidase produced from an indigenous white rot fungal strain *Ganoderma lucidum*, Iqbal and Asgher *BMC Biotechnology* (2013) 13-56
- [235] F. Jamal, T. Qidwai, P.K. Pandey, R. Singh, S. Singh, Azo and anthraquinone dye decolorization in relation to its molecular structure using soluble *Trichosanthes dioica* peroxidase supplemented with redox mediator, *Catalysis Communications*, 12 (2011) 1218–1223
- [236] S. Preethi, A. Anumary, M. Ashokkumar, P. Thanikaivelan, Probing horseradish peroxidase catalysed degradation of azo dye from tannery wastewater, *Springer Plus* 2(341) (2013)1-8.
- [237] M. Masuda, A. Sakurai, M. Sakakibara Effect of enzyme impurities on phenol removal by the method of polymerization and precipitation catalyzed by *Coprinus cinereus* peroxidase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(2001) 494–499
- [238] U. Kalsoom, S.S. Ashraf, M. A. Meetani, M.A. Rauf and H.N. Bhatti. Mechanistic study of a diazo dye degradation by Soybean Peroxidase, *Chemistry Central Journal*, 7(93)(2013)1-10.
- [239] M.A.Duarte-Vázquez, B. E. Garcia-Almendarez, C. Regalado, J.R. Whitaker. Purification and Properties of a Neutral Peroxidase Isozyme from Turnip (*Brassica napus* L. Var. Purple Top White Globe) Roots, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2001)4450-4456
- [240] R.M. Silverstein, G.C. Basdler, T.C. Morrill, Spectrophotometric identification of organic compounds, 5<sup>th</sup> edition Wiley, New York (1991)
- [241] J. Yang, Analysis of dye, Beijing, Chemical Industry Press. 156-163, 1987
- [242] J. Coates, Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, (2000)10815–10837

- [243] M. Neamtu, A. Yedile, I. Siminiceanu, A. Kettrup, Oxidation of commercial reactive azo dye aqueous solutions by the photo-Fenton and Fenton-like processes, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 161 (2003) 87–93
- [244] B. Lodha, S. Chaudhari, Optimization of Fenton-biological treatment scheme for the treatment of aqueous dye solutions, *Journal of Hazardous Materials*, 148 (2007) 459–466
- [245] H. Lee, M. Shoda, Removal of COD and color from livestock wastewater by the Fenton method, *Journal of Hazardous Materials* 153 (2008) 1314–1319
- [246] S-P. Sun, C-J. Li, J-H. Sun, S-H. Shi, M-H. Fand, Q. Zhou, Decolorization of an azo dye Orange G in aqueous solution by Fenton oxidation process: Effect of system parameters and kinetic study, *Journal of Hazardous Materials*, 161 (2009) 1052–1057
- [247] M. S. Lucas, J.A. Peres, Decolorization of the azo dye Reactive Black 5 by Fenton and photo-Fenton oxidation, *Dyes and Pigments* 71 (2006) 236-244
- [248] N. Modirshahla, M.A. Behnajady, F. Ghanbary, Decolorization and mineralization of C.I. Acid Yellow 23 by Fenton and photo-Fenton processes, *Dyes and Pigments* 73 (2007) 305-310
- [249] M.A. Behnajady, N. Modirshahla, F. Ghanbary, A kinetic model for the decolorization of C.I. Acid Yellow 23 by Fenton process. *Journal of Hazardous Materials*, 148 (2007) 98–102
- [250] F. Emami, A.R. Tehrani-Bagha, K. Gharanjig, F.M. Menger, Kinetic study of the factors controlling Fenton-promoted destruction of a non-biodegradable dye, *Desalination* 257 (2010) 124–128
- [251] N. Ertugay, F. N. Acar, Removal of COD and color from Direct Blue 71 azo dye wastewater by Fenton's oxidation: Kinetic study, *Arabian Journal of Chemistry* (2013), article en press
- [252] E.G. Solozhenko, N.M. Soboleva, V.V. Goncharuk, Decolourization of azo dye solutions by Fenton's oxidation, *Water Research*, 29(9)(1995) 2206-2210
- [253] S. Hisaindee, M.A. Meetani, M.A. Rauf, Application of LC-MS to the analysis of advanced oxidation process (AOP) degradation of dye products and reaction mechanisms, *Trends in Analytical Chemistry*, 49 (2013) 31–44
- [254] P.K. Malik, S.K. Saha, Oxidation of direct dyes with hydrogen peroxide using ferrous ion as catalyst, *Separation and Purification Technology*, 31 (2003) 241-250
- [255] I. Casero, D. Sicilia, S. Robio, D.P. Bendito, Chemical degradation of aromatic amines by Fenton's reagent, *Water Research*, 31 (8) (1997) 1985-1995
- [256] F. Zucconi, A. Monaco, M. Forte, M. De-Bertoldi, Phytotoxins during the stabilization of organic matter, In: Gasser, J.K.R, *Composting of Agricultural and Other Wastes*. Elsevier Applied Science Publishers, New York, (1985)73–86
- [257] R.G. Saratale, G.D. Saratale, J.S. Chang, S.P. Govindwar, Decolorization and biodegradation of textile dye Navy blue HER by *Trichosporon beigelii* NCIM-3326. *Journal of Hazardous Materials*, 166 (2009) 1421–1428

# ANNEXES

---

## Annexe 1

**Tableau 1.1. Réactions impliquées dans la transformation du peroxyde d'hydrogène par les ions du fer, d'après [190]**

N°	Réaction	Constante de réaction
A.1	$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})]^{2+} + \text{H}^+$	$2.9 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (pKa = 2.3)
A.2	$\text{Fe}^{3+} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2^+ + 2 \text{H}^+$	$7.62 \cdot 10^{-7} (\text{mol.L}^{-1})^2$
A.3	$[\text{Fe}^{3+}(\text{OH})]^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2^+ + \text{H}^+$	pKa = 3.6
A.4	$\text{Fe}(\text{OH})_2^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_{3(\text{s})} + 2 \text{H}^+$	pKa = 7.9
A.5	$2 \text{Fe}^{3+} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+} + 2 \text{H}^+$	$8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$
A.6	$\text{Fe}^{3+} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3^0 + 3 \text{H}^+$	$10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$
A.7	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$	40-80 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.8	$[\text{Fe}^{2+}(\text{HO}_2)(\text{H}_2\text{O})_5]^+ \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{HO})(\text{H}_2\text{O})_5]^+ \text{OH}^\bullet$	
A.9	$\text{Fe}^{3+} + 3/2 \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{OH})(\text{HO}_2)]^+ + \text{H}^+$	$K=3.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
A.10	$[\text{Fe}^{3+}(\text{OH})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{OH})(\text{HO}_2)]^+ + \text{H}^+$	$K=2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
A.11	$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{HO}_2)]^{2+} + \text{H}^+$	$3.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
A.12	$[\text{Fe}^{3+}(\text{HO}_2)]^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2^\bullet$	$2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
A.13	$[\text{Fe}^{3+}(\text{OH})(\text{HO}_2)]^+ \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2^\bullet + \text{HO}^-$	$2.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
A.14	$[\text{Fe}(\text{HO}_2)]^{2+} + [\text{Fe}^{3+}(\text{HO})]^{2+} \rightarrow 2\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$5 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.15	$\text{Fe}^{2+} + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$	$(2.5-5) \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.16	$\text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}_2^-$	$8 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.17	$\text{Fe}^{3+} + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}^+$	$< 2 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.18	$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$	$5 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.19	$\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}(\text{HO}_2)^{2+}$	$1.2 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.20	$\text{HO}^\bullet + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	$3.0 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.21	$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{HO}_2^\bullet$	$10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (pKa=4,8)
A.22	$\text{HO}_2^\bullet + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	$1.8 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.23	$\text{HO}_2^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 + \text{HO}^-$	$9.7 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.24	$\text{HO}_2^\bullet + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	$0.71 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.25	$\text{HO}^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{HO}^- + \text{O}_2$	$1.01 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A.26	$\text{HO}^\bullet + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	$5.2 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

## Annexe 2

**Tableau 2.1. Réactifs chimiques, protéines et solutions tampon utilisés**

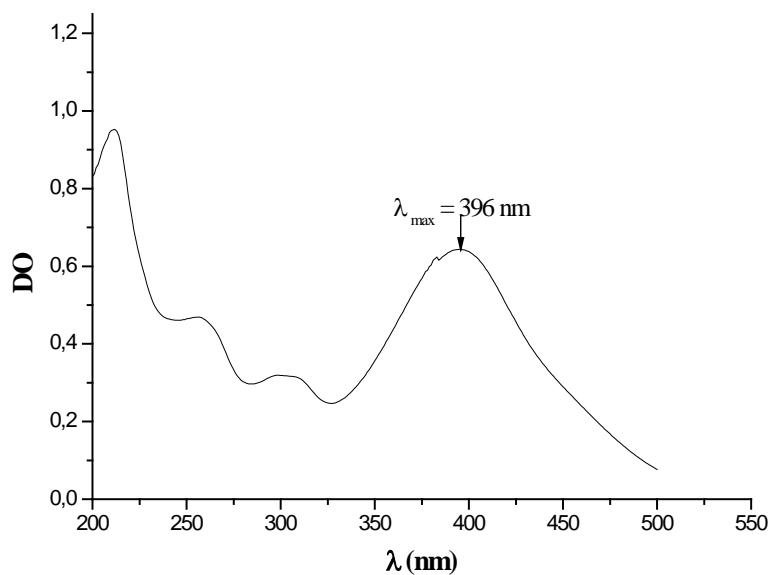
Réactif /solvant/protéine	Formule chimique	Fournisseur
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	Sigma-Aldrich
Ethanol	95 %	Reidel-de-Haën
Phénol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	Merck
4-Amino-antipyrine	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O	Sigma-Aldrich
Acétone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (85 %)	Sigma-Aldrich
Alginate de sodium	(C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> COO <sup>-</sup> ,Na <sup>+</sup> ) <sub>n</sub>	Sigma-Aldrich
Chlorure de calcium (II)	CaCl <sub>2</sub>	Fluka
Chlorure de sodium	NaCl	Fluka
Chlorure de plomb (II)	PbCl <sub>2</sub>	Merck
Sulfate de fer hepta-hydraté	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Fluka
Sulfate de Chrome dodecahydraté	Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .12H <sub>2</sub> O	Fluka
Réactif bleu de coomassie		Sigma-Aldrich
Acide phosphorique	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Reidel-de-Haën
Acide sulfurique	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%)	Reidel-de-Haën
Hydroxyde de sodium	NaOH	Reidel-de-Haën
Chlorure de potassium	KCl	Reidel-de-Haën
Chlorure d'aluminium(III)	AlCl <sub>3</sub>	Reidel-de-Haën
Chlorure de zinc (II)	ZnCl <sub>2</sub>	Reidel-de-Haën
Chlorure de fer (III)	FeCl <sub>3</sub>	Reidel-de-Haën
Sulfate de magnésium (II)	MgSO <sub>4</sub>	Reidel-de-Haën
Les protéines : SAB, cytochrome, β-amylase et HRP		Sigma-Aldrich
Résine Sephadex	G100	Sigma-Aldrich

Les solutions tampon sont préparées au laboratoire selon la pharmacopée américaine 2001 et l'ajustement de pH se fait par la solution de NaOH ou HCl à 0.2 N:

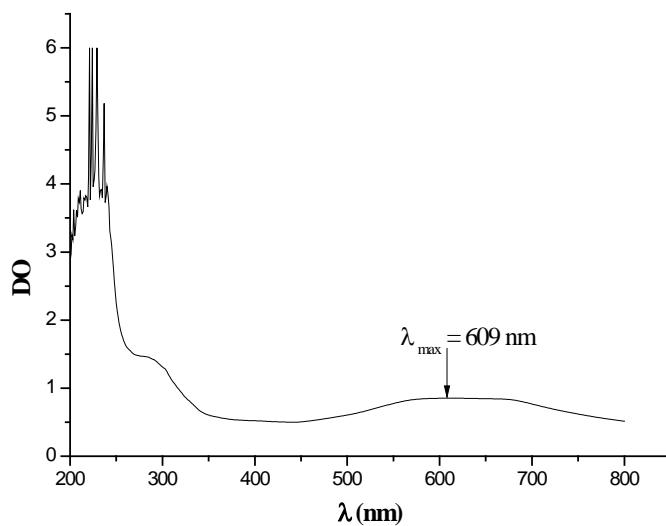
- Tampon pH 2 : par le chlorure de sodium
- Tampon pH 3, 4 et 5 : par le biphtalate de potassium
- Tampon pH 6 et par le phosphate de potassium monobasique
- Tampon pH 8, 9 et 10 par le chlorure de sodium et acide borique

### Annexe 3

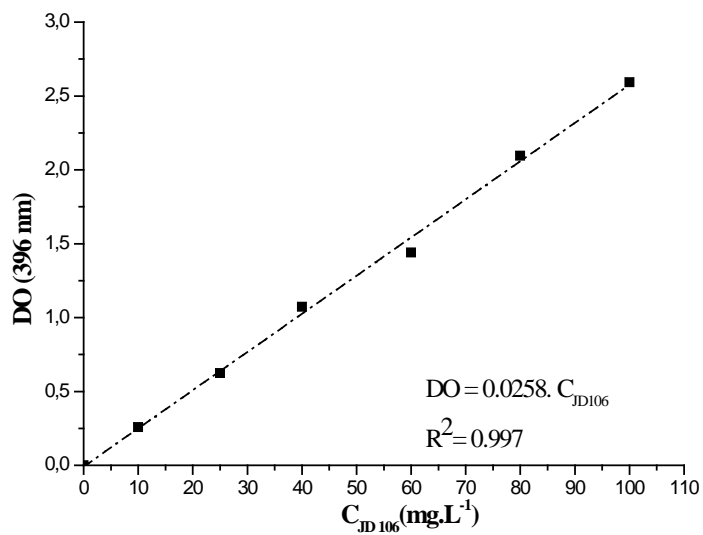
#### Caractérisation des colorants étudiés par UV-visible



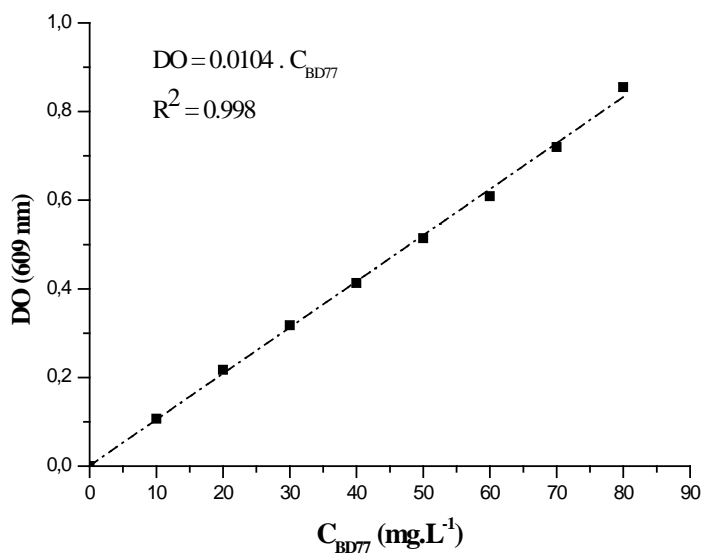
**Figure 3.1.** Variation de la DO en fonction de  $\lambda$  pour le JD 106.



**Figure 3.2.** Variation de l'absorbance en fonction de  $\lambda$  pour le BD 77



**Figure 3.3.** Courbe d'étalonnage de JD 106



**Figure 3.4.** Courbe d'étalonnage de BD 77

## Annexe 4

### Caractérisation des colorants étudiés par IRTF

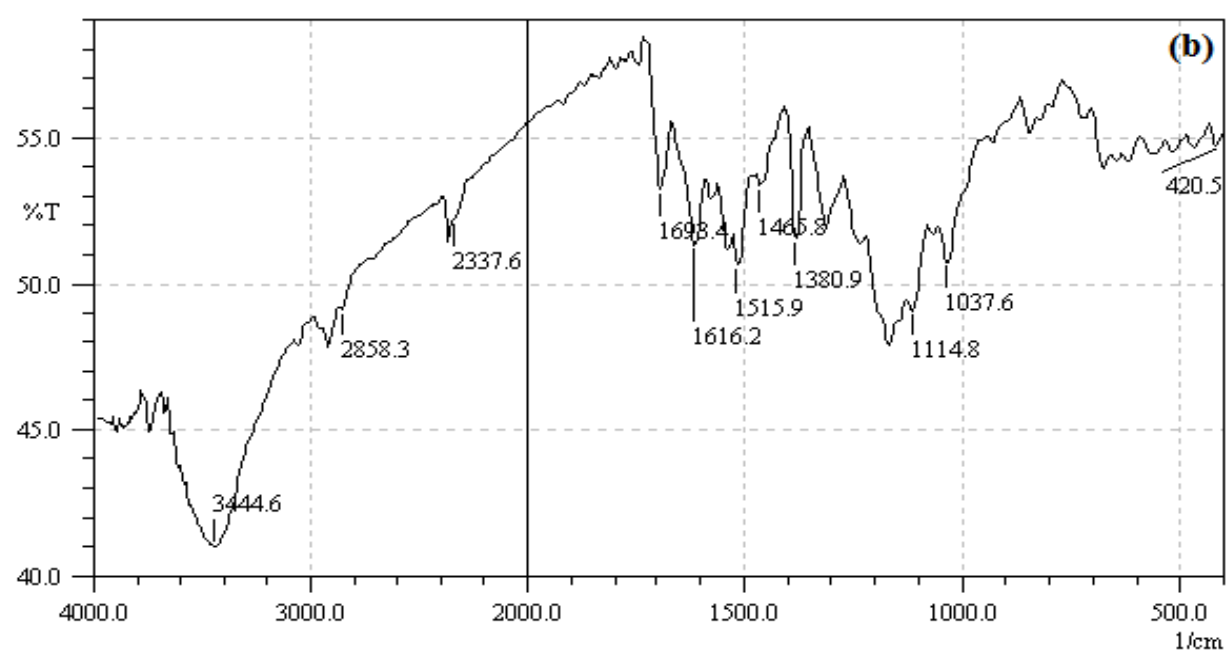
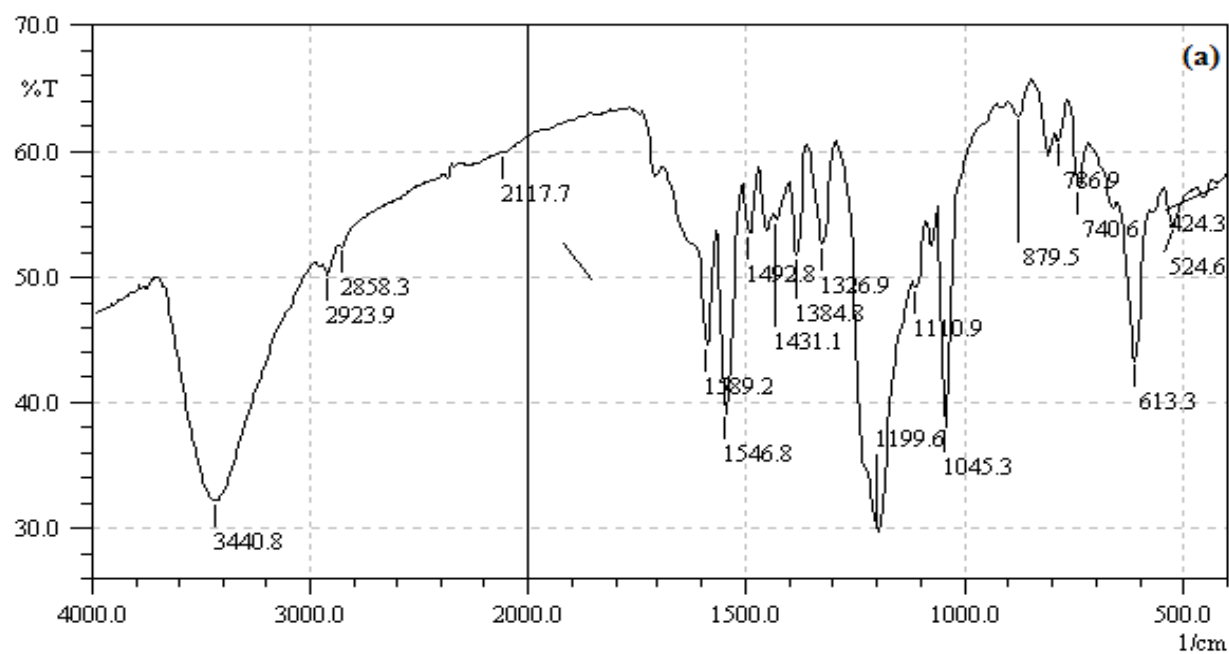
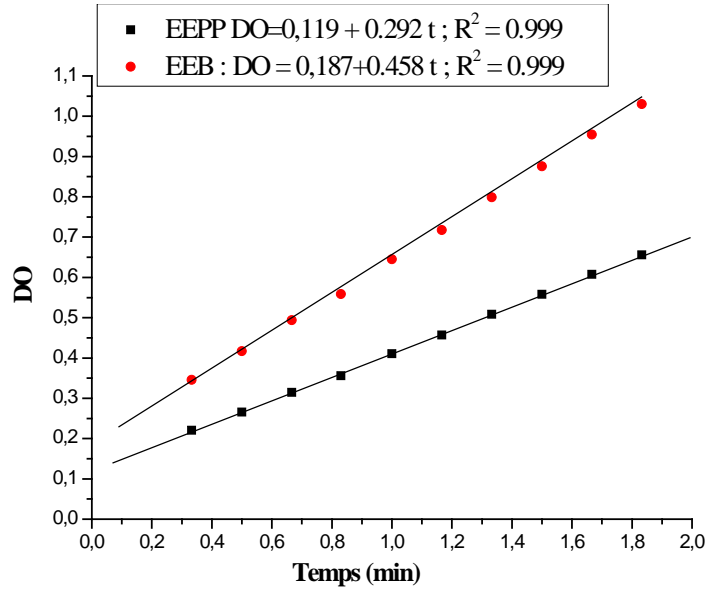


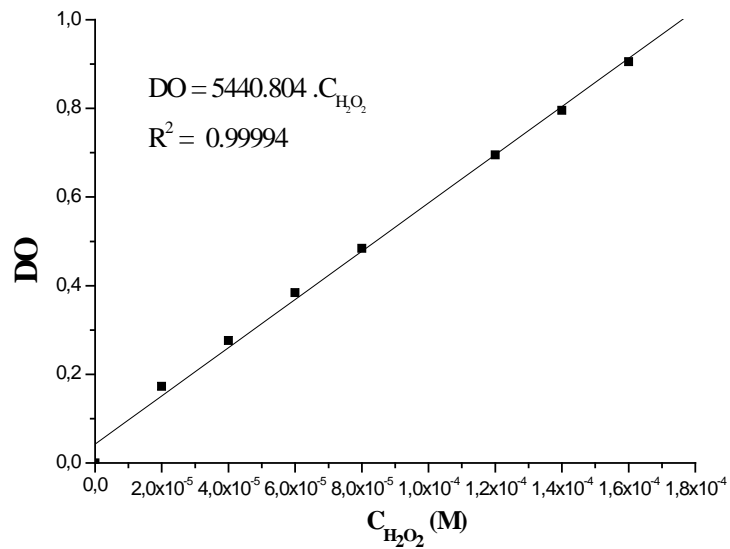
Figure 4. Spectres IR de JD 106 (a) et BD 77 (b)

## Annexe 5

### Courbes d'étalonnage de $H_2O_2$ et cinétique enzymatique des extraits enzymatiques



**Figure 5.1.** Variation de la DO en fonction du temps pour l'EEB et l'EEP (pH 7, T ambiante,  $\lambda = 517$  nm).



**Figure 5.2.** Courbes d'étalonnage de  $H_2O_2$  (pH 7, T ambiante,  $\lambda = 517$  nm)

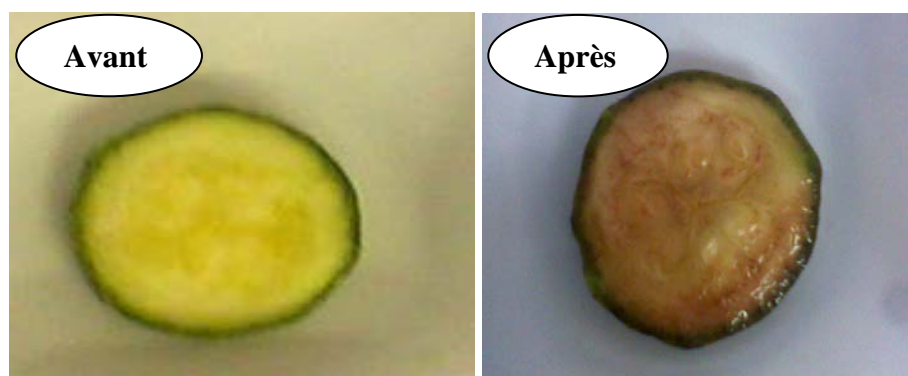
## Annexe 5

### Test d'activité enzymatique sur le fruit de courgette

**Méthode :** le mélange réactionnel contient :

- 2 ml de solution tampon pH 7.
- 1 ml d'  $H_2O_2$  de concentration 0,01M.
- 1 ml de 4- Amino –antipyrine à 0.001M.
- 1 ml de phénol à 0.01M.

Pour deux tranches de courgette on ajoute un volume de 3 ml de mélange précédent est en contact à l'une des tranches et à l'autre le même volume d'eau distillée qui servira comme témoin .on laisse la coloration se développer pendant 15 min.



**Photos 5.1.** Mise en évidence de l'activité enzymatique de la peroxydase dans la courgette.

Le témoin reste incolore, mais la 2<sup>ème</sup> tranche a devenue rose après. Les tissus et la paroi sont colorés en rose ce qui montre la présence de la peroxydase.

## Annexe 6

### Dosage des protéines par la méthode de Bradford [206]

#### Principe

La technique de Bradford utilise la fixation du bleu de Coomassie sur les protéines. Ce colorant existe sous 3 formes : une forme anionique colorée en bleu ( $\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$ ), une forme cationique rouge ( $\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$ ) et une forme neutre verte ( $\lambda_{\max} = 650 \text{ nm}$ ). C'est la forme anionique qui se fixerait préférentiellement aux protéines grâce à des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques des protéines (plus particulièrement les groupements fonctionnels basiques et/ou aromatiques).

#### Méthode

La quantité des protéines totale de chaque extrait enzymatique (brut, partiellement purifié) est dosée selon la méthode de Bradford. La concentration est déterminée à l'aide d'un courbe étalon de sérum d'albumine bovin SAB, en ajoutant 0.1 ml de sérum à différentes concentrations au 5 ml de réactif de Coomassie et 0,25ml de Hydroxyde de sodium (NaOH) de concentration 1 M. La densité optique de chaque échantillon sera observé en mesurant l'absorbance à 595 nm.

Les réactifs de utilisées ont les compositions chimiques suivants :

- Réactifs(1) : Réactifs de Bradford contient :
  - Bleu de Coomassie ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ).
  - Ethanol 95% (50 ml).
  - $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% (100 ml).
  - Après dissolution, on complète avec l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.

Le mélange est conservé 24h sous agitation à l'obscurité puis on réalise une filtration.

- Réactifs(2) : Hydroxyde de sodium à 1M.
- Réactifs(3) : Etalon de SAB.

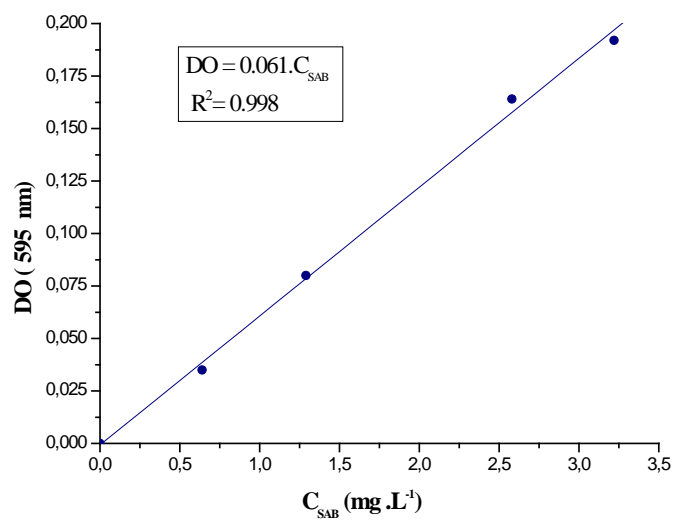
La détermination de la courbe d'étalonnage de sérum d'albumine bovin (SAB) est résumée dans le tableau Suivant :

**Tableau 6.1.** Courbe d'étalonnage de sérum d'albumine(SAB)

Tube N° (C ( $\text{g.L}^{-1}$ ))	0 (0 $\text{mg.L}^{-1}$ )	1 (25 $\text{mg.L}^{-1}$ )	2(50 $\text{mg.L}^{-1}$ )	3 (75 $\text{mg.L}^{-1}$ )	4(100 $\text{mg.L}^{-1}$ )	X
V Etalon	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
V NaOH (1M)	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$
V réactif de Bradford	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml

- Agiter les solutions puis laisser la coloration se développer 10min.

La courbe d'étalonnage de protéine SAB obtenue est la suivante :



**Figure 6.1.** Courbe d'étalonnage de Protéine SAB

## Annexe 7

Représentation des précipités et des surnageant produits par procédés de traitements enzymatique et Fenton.



**Figure 7.1.** Photos des solutions des colorants et leurs précipités et surnageant après traitement par C-peroxydase, (a) : JD 106 et (b) : BD 77



**Figure 7.2.** Photos des solutions des colorants et leurs précipités et surnageant après traitement par procédé Fenton, (a) : JD 106 et (b) : BD 77

## Annexe 8

### Représentations graphiques des modèles cinétiques de décoloration par réaction

#### Fenton

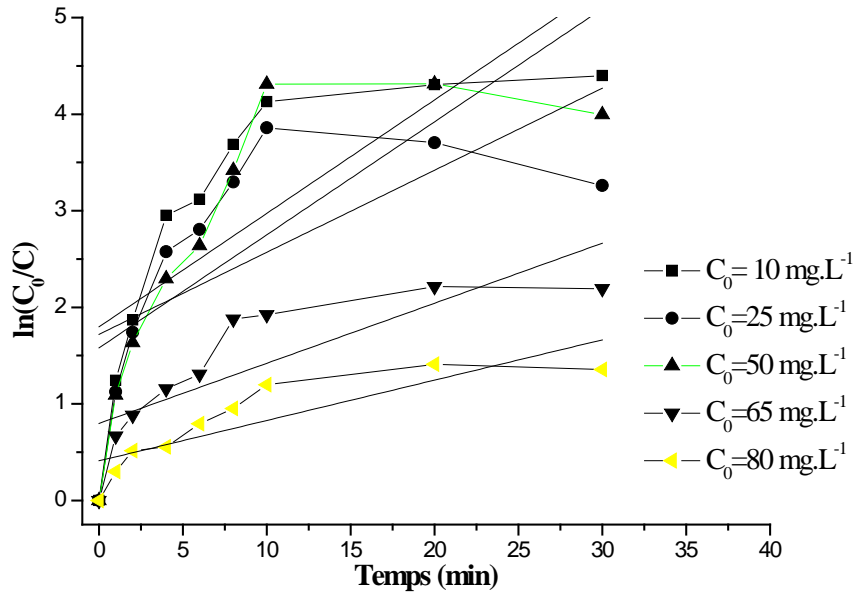


Figure 8.1. Représentation de modèle cinétique de réaction d'ordre 1 de décoloration de JD 106 pour différentes concentrations initiales de colorant

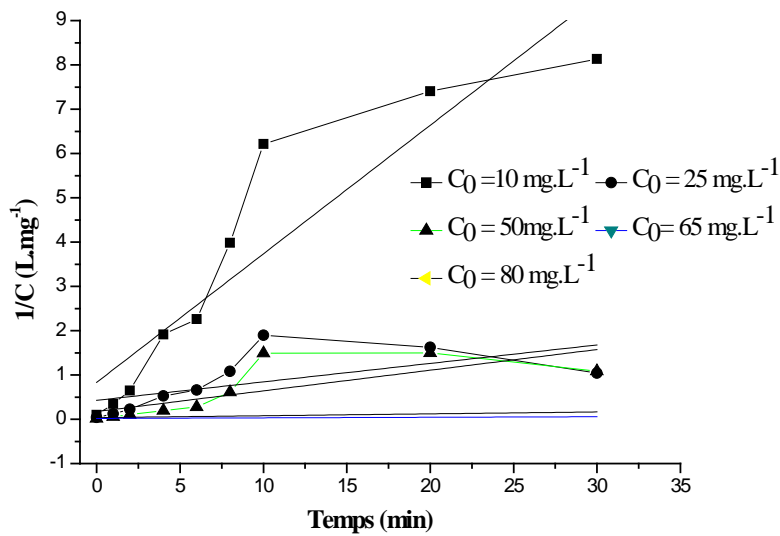
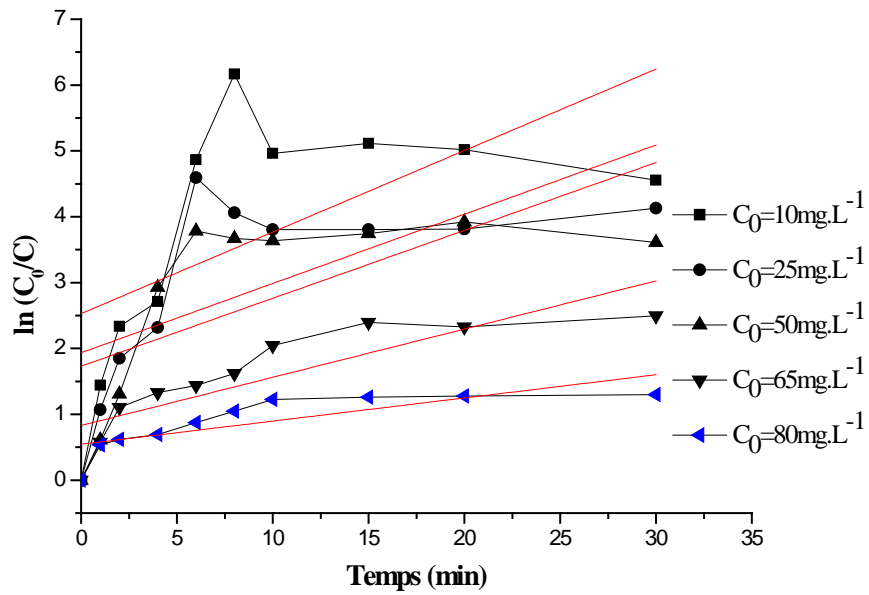
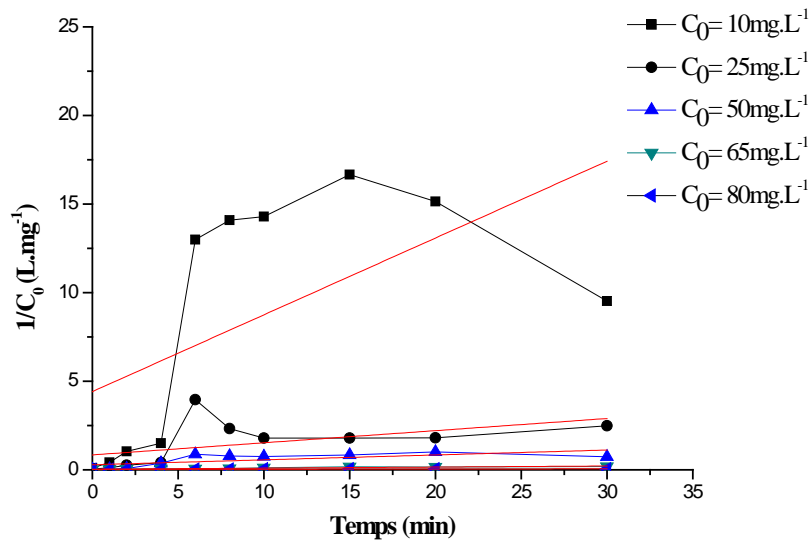


Figure 8.2. Représentation de modèle cinétique de réaction d'ordre 2 de décoloration de JD 106 pour différentes concentrations initiales de colorant



**Figure 8.3.** Représentation de modèle cinétique de réaction d'ordre 2 de décoloration de BD 77 pour différentes concentrations initiales de colorant



**Figure 8.4.** Représentation de modèle cinétique de réaction d'ordre 2 de décoloration de BD 77 pour différentes concentrations initiales de colorant

## Annexe 9

### Chromatogramme des solutions de JD 106 avant et après traitement

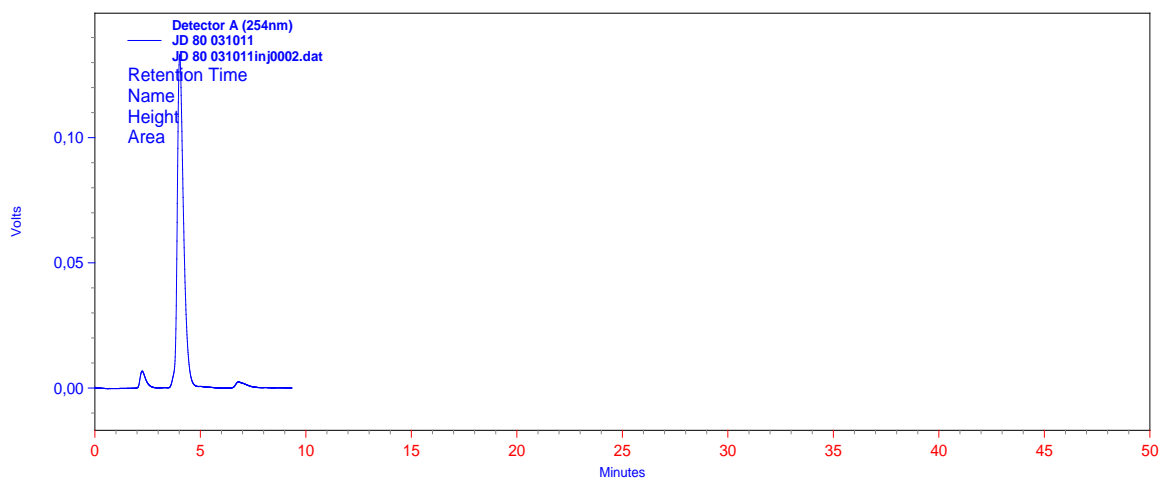


Figure 9.1. Chromatogramme de la solution de JD 106

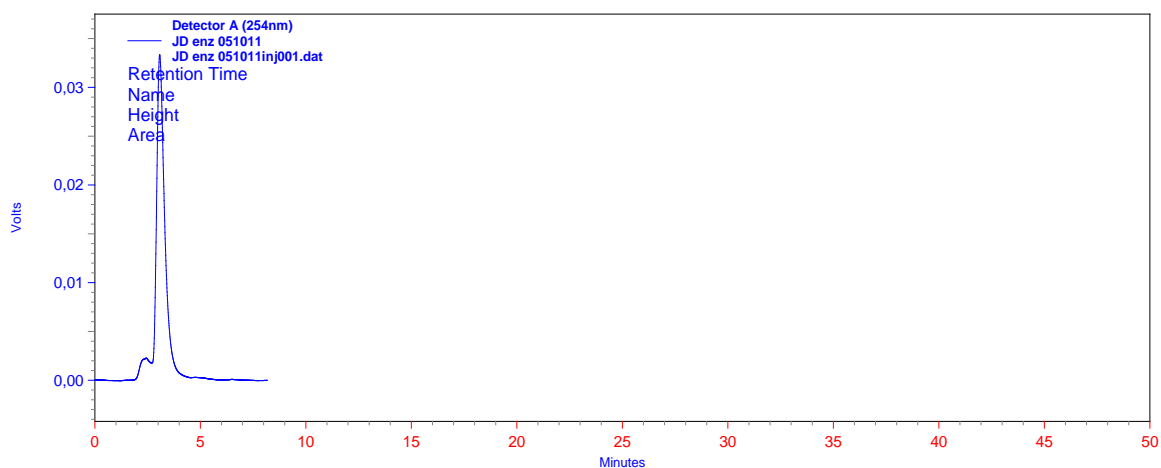


Figure 9.2. Chromatogramme de la solution de JD 106 après traitement enzymatique

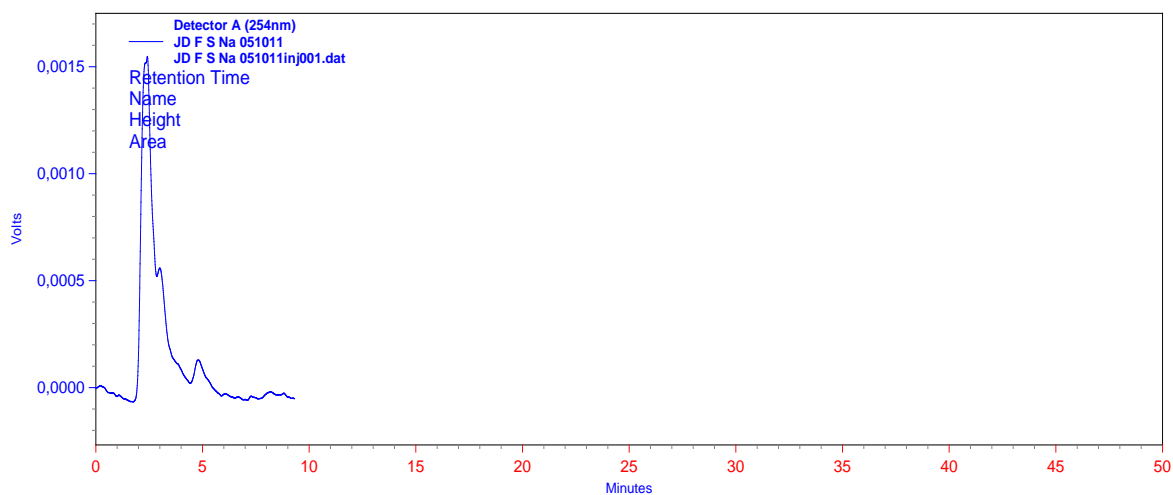
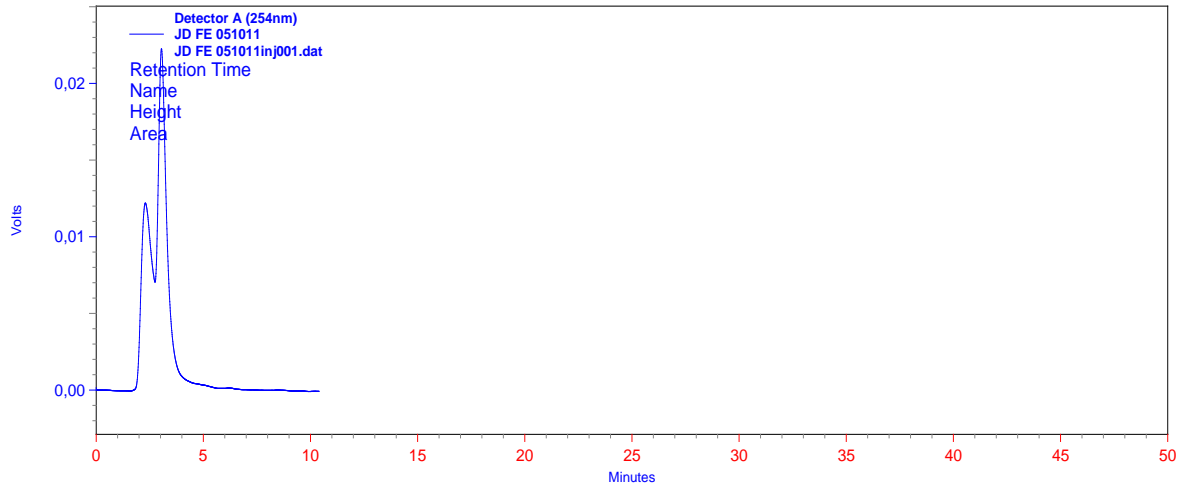
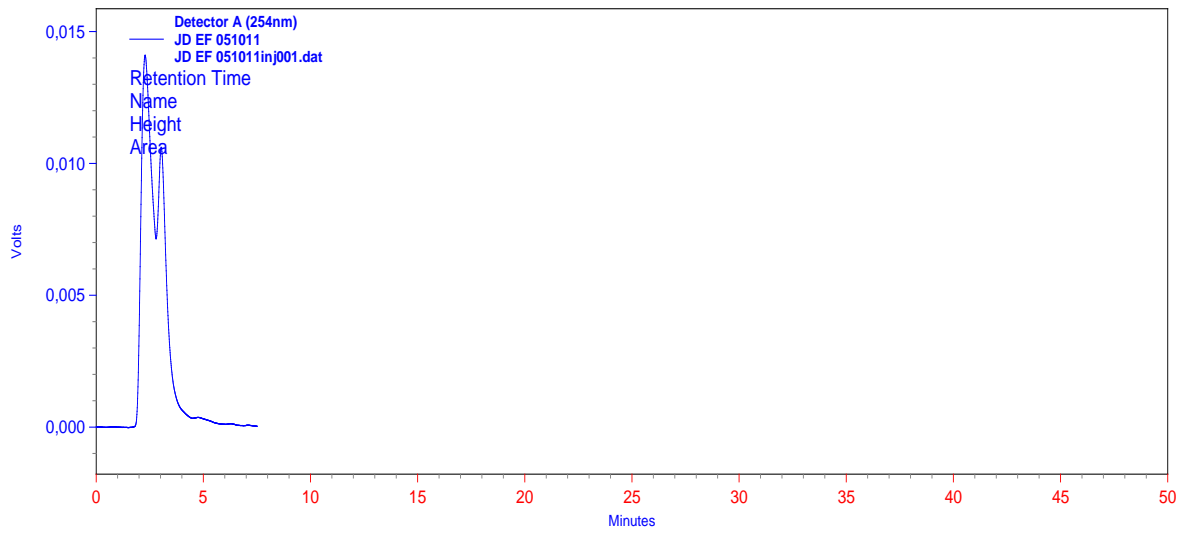


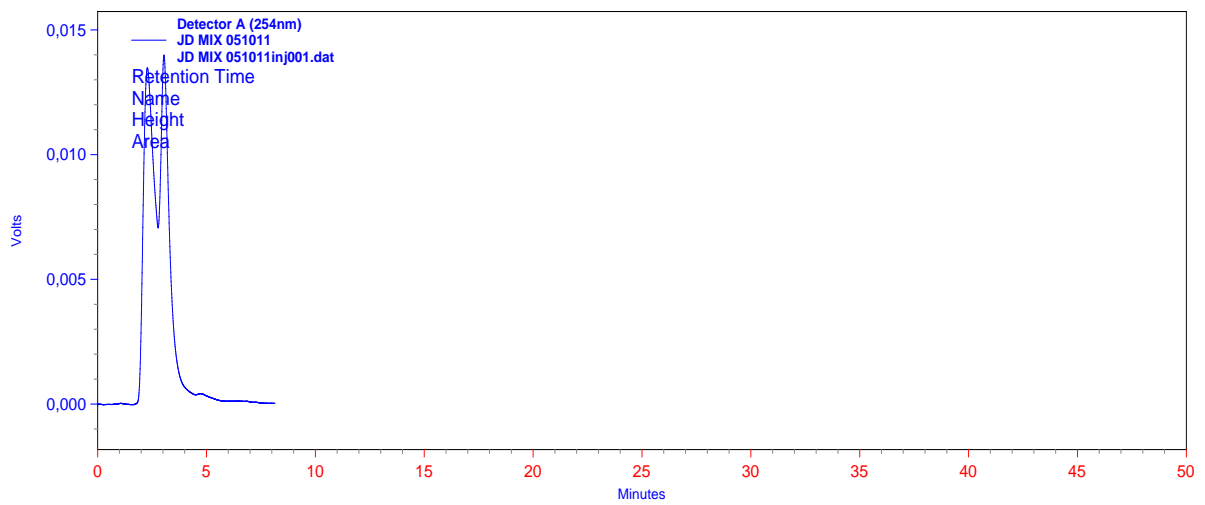
Figure 9.3. Chromatogramme de la solution de JD 106 après traitement Fenton



**Figure 9.4.** Chromatogramme de la solution de JD 106 après traitement F-E



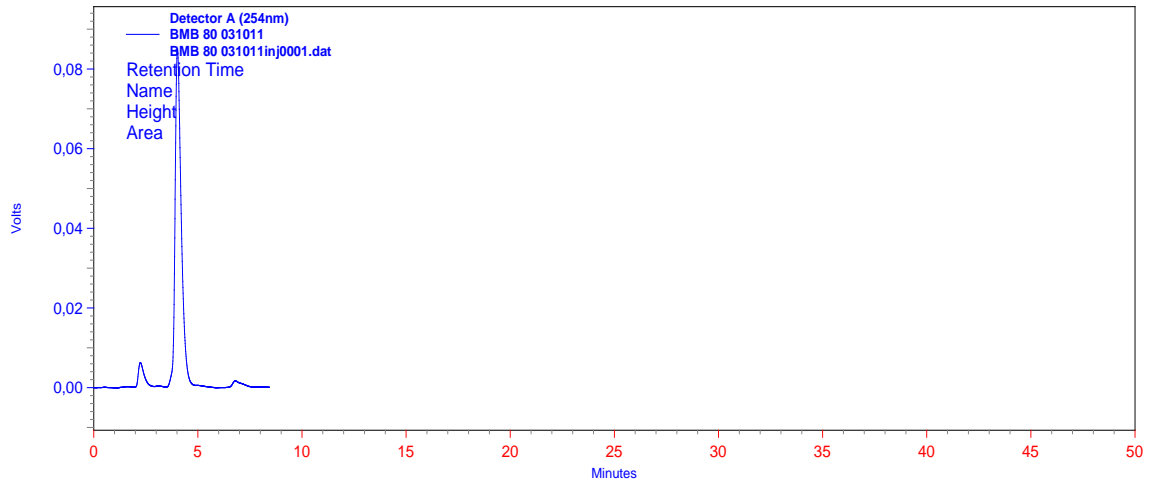
**Figure 9.5.** Chromatogramme de la solution de JD 106 après traitement E-F



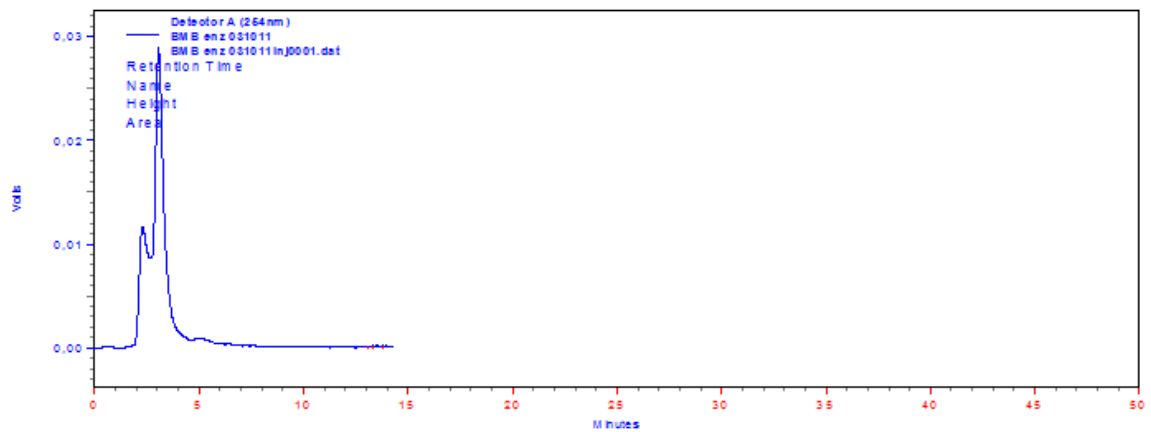
**Figure 9.6.** Chromatogramme de la solution de JD 106 après couplage simultané

# Annexe 10

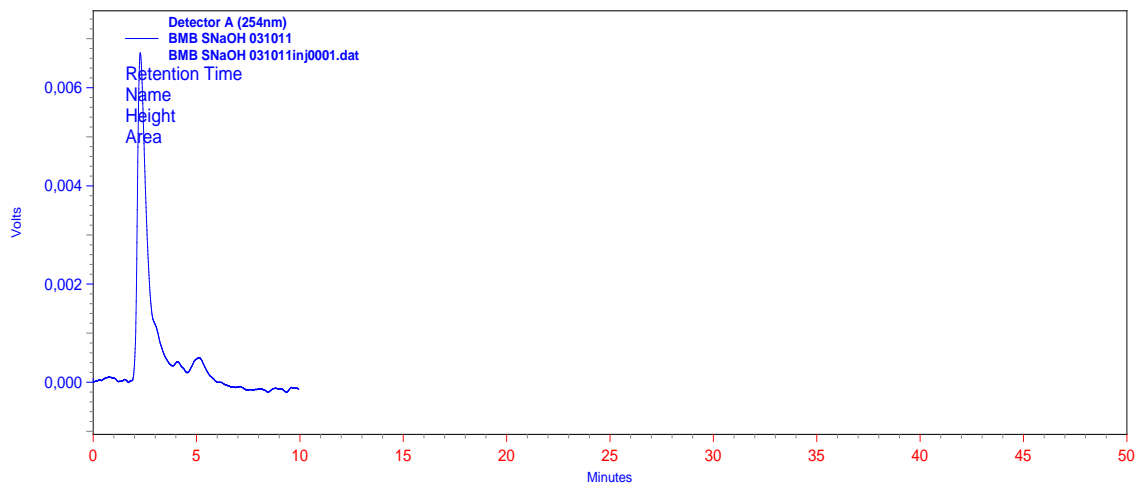
## Chromatogramme des solutions de BD 77 avant et après traitement



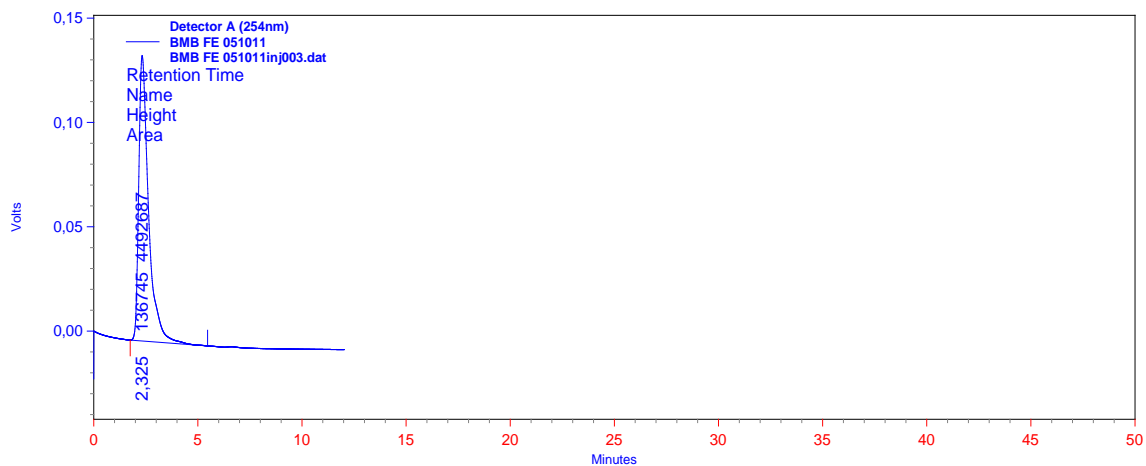
**Figure 10.1.** Chromatogramme de la solution de BD 77



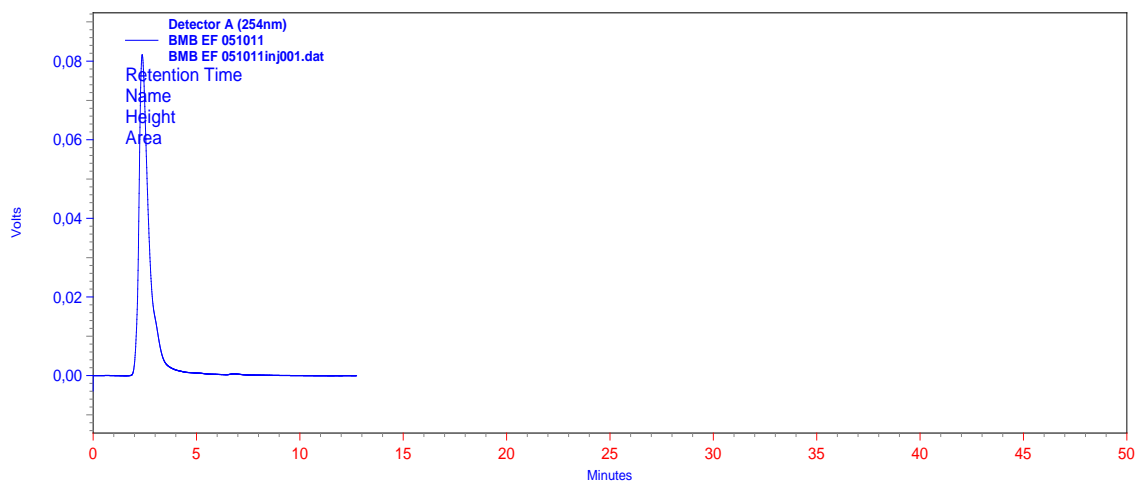
**Figure 10.2.** Chromatogramme de la solution de BD 77 après traitement enzymatique



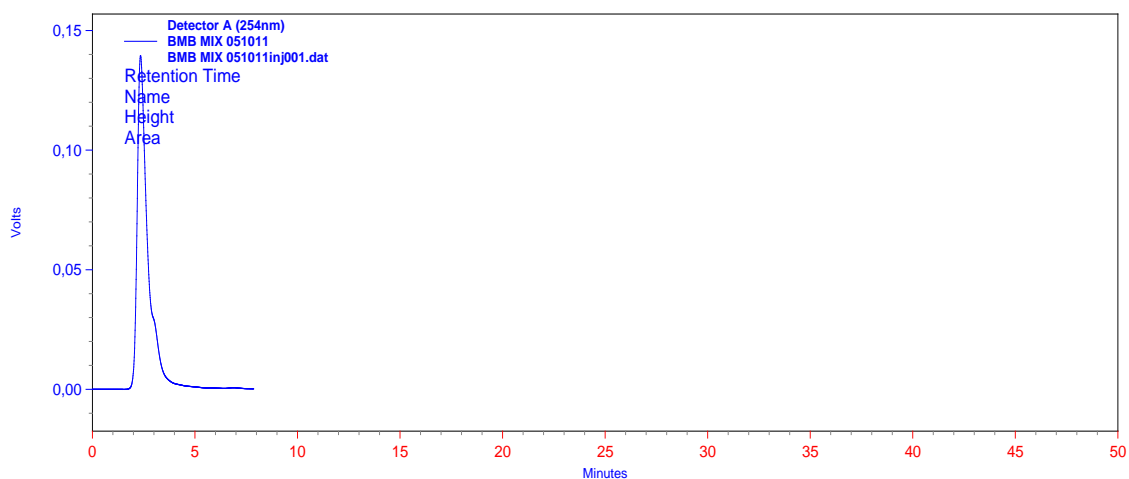
**Figure 10.3.** Chromatogramme de la solution de BD 77 après traitement Fenton



**Figure 10.4.** Chromatogramme de la solution de BD 77 après traitement F-E



**Figure 10.5.** Chromatogramme de la solution de BD 77 après traitement E-F



**Figure 10.6.** Chromatogramme de la solution de BD 77 après couplage simultané