République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

UNIVERSITE DR YAHIA FARES DE MEDEA
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département de Génie des Procédés et de L'Environnement

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue d'obtention du diplôme de Master

En : Génie des Procédés

Option : Pollution Chimique et Gestion Environnementale

ETUDE DE L'ELIMINATION DES ANTIBIOTIQUES A PARTIR DES EAUX USEES AU MOYEN D'UN BIOSURFACTANT

Proposé et dirigé par :
Dr. Benkortbi Othmane
Mme Boukhelkhal Asmaa

Présenté par :
Boukhelkhal Nassiba
Kouidri Zineb

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014-2015

Dédicaces

A mes parents, vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez.

A mes sœurs, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement et l'amour que je porte pour vous.

A mon neveu Yasser, je t'aime de tout mon cœur.

A tous les membres de ma famille, petits et grands, je vous exprime toute mon affection.

A ma binôme et ma très chère amie Zineb, En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble.

A Faiza, Nabila, Cherifa et Lina vous partagerez toujours une partie de ma vie et de mon cœur.

A Meriem, toujours présente pour m'écouter et me faire sourire, un merci très particulier à toi.

A tous mes amis de la promotion 2015 de Pollution chimique et gestion environnementale, Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

Je vous dédie tous ce modeste travail en témoignage de mon profond amour.

Nassiba

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à

La mémoire de mon père, qu'Allah lui garde dans son vaste paradis

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mes grands parents, aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

Ma petite cousine et sœur que je l'adore Tesnim.

A ma binôme et mon amie Nassiba.

A Wissem, Fouzia, Mohamed, Zine el abidine, Amine, Nazou et Mazora.

A tous les membres de ma famille, petits et grands.

Zineb

Remerciements

Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été menées essentiellement au laboratoire d'analyses physicochimiques au niveau du hall technologique de la faculté des sciences et de la technologie à l'université du Médéa. Par ailleurs, les études HPLC ont été réalisées au laboratoire du département de contrôle de qualité du complexe SAIDAL de Médéa.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude à Dr. Benkortbi Othman, notre promoteur sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à Mme Boukhelkhal Asma, notre Co promotrice pour sa disponibilité, son aide, ses encouragements et ses conseils scientifiques et également pour son accueil, sa gentillesse et son écoute.

Nous sommes très sensibles à l'honneur que nous fait les membres de jury, en acceptant d'examiner ce travail et de siéger à notre soutenance.

Nous remercions vivement Mr. Mahamado Harouna Bassiro pour sa contribution, son soutien et sa sympathie.

Nos remerciements s'adressent aussi au personnel de laboratoire d'analyses physicochimiques au niveau du hall technologique en particulier Mlle Benhaoua Meriem pour tous nos moments d'amitié durant les pauses au laboratoire.

Nous sommes également reconnaissant à tout personnel du laboratoire de contrôle de qualité au complexe SAIDAL surtout Mr. Chaaban ahmed pour son accueil et son aide.

Nos remerciements s'adressent à toutes les personnes, qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, mais sans lesquelles il n'aurait pu aboutir à ce jour sous cette forme.

ملخص : دراسة إزالة المضادات الحيوية من المياه المستعملة بواسطة مؤثر سطحي بيولوجي

اثبتت الدراسات تواجد المضادات الحيوية في مختلف المسطحات المائية و مساهمتها في التلوث البيئي وذلك يعود لكون التقنيات التقليدية المستعملة لمعالجة المياه غير فعالة لإزالتها. هذا العمل يهدف الى المساهمة في تنقية الأوساط المائية الملوثة بالمضادات الحيوية عن طريق دراسة إزالة الاموكسيسلين والامبيسلين عبر مؤثر سطحي بيولوجي يتميز بانه قابل للتحلل وغير سام. تمت دراسة العوامل الرئيسية المؤثرة على مردود الطريقة المستعملة و هي: وقت الاتصال، سرعة التحريك، تركيز المضاد الحيوي، تركيز المؤثر السطحي البيولوجي، درجة الحرارة، الحموضة و تواجد الملح. مجموع النتائج المحصل عليها يظهر انه يتم بلوغ التوازن خلال 20 دقيقة و ان الحد الأقصى للامتزاز يتوافق مع سرعة تحريك تساوي 400 دورة في الدقيقة، تركيز ابتدائي للمضاد الحيوي 0.04 غ في اللتر, تركيز المضاد المؤثر السطحي البيولوجي 0.024 غ في اللتر الموافق لتركيزه المذيلي الحرج, درجة حموضة معتدلة, درجة حرارة 20° سلسيوس. في هذه الشروط التجريبية الأمثل نسبة إزالة بلغت 56.86 بالنسبة للاموكسيسلين و 69.41 بالنسبة للامبيسيلين.

الكلمات المفتاحية: اموكسيسلين، امبيسلين، مؤثر سطحي بيولوجي، امتزاز، الأوساط المائي

RESUME : Etude de l'élimination des antibiotiques à partir des eaux usées au moyen d'un biosurfactant

Les études récentes ont montré que les antibiotiques peuvent être trouvés dans les différentes matrices d'eau en contribuant à la pollution de l'environnement du fait que les techniques traditionnelles de traitement des eaux sont insuffisantes pour leur élimination complète. Le présent travail, qui s'inscrit dans ce contexte, a pour objet d'apporter une contribution à la purification des milieux aqueux contaminés par des antibiotiques en étudiant l'élimination de l'amoxicilline et de l'ampicilline au moyen d'un biosurfactant ayant l'avantage d'être biodégradable et non toxique. Les principaux paramètres influençant le rendement du procédé envisagé ont été ainsi étudiés, à savoir le temps de contact, la vitesse d'agitation, la concentration en antibiotiques, la masse du biosurfactant, la température, le pH, et la présence de sels. L'ensemble des résultats obtenus montre que l'équilibre est atteint au bout de 20 minutes est que le maximum d'adsorption correspond à une vitesse d'agitation de 400 trs/min, une concentration initiale d'antibiotique égale à 0.04 g/l, une concentration en biosurfactant correspondante à sa CMC, un pH neutre, une température de 20°C et en présence du phosphate de sodium. Dans ces conditions opératoires optimales, les taux de rétentions maximales sont de 56.86 % pour l'amoxicilline et 69.41 % pour l'ampicilline.

Mots clés : amoxicilline, ampicilline, biosurfactant, adsorption, milieux aqueux.

Abstract : Study of elimination of antibiotics from waste water using a biosurfactant

Recent studies have shown that antibiotics can be found in the different matrices of water contributing to environmental pollution because of the fact that conventional water treatment technologies are insufficient for their complete elimination. This work, which comes within this context, is to make a contribution to the purification of aqueous environments contaminated by antibiotics by studying the elimination of amoxicillin and ampicillin using a biosurfactant which have the advantage of being biodegradable and nontoxic. The main parameters that influence the performance of the proposed process were studied as well, namely the contact time, the stirring speed, the concentration of antibiotics, the concentration of the biosurfactant, temperature, pH, and the presence of salts. The overall results show that the equilibrium is reached after 20 minutes and the adsorption maximum corresponds to a stirring speed of 400 round/ min, an initial concentration of antibiotic equal to 0.04 g / l , a concentration of biosurfactant corresponding to its CMC equal to 0.024 g/l, a neutral pH, a temperature of 20 ° C and in the presence of sodium phosphate. In these optimal operating conditions, the maximum retention rates are 56.86% for amoxicillin and 69.41% for ampicillin.

Key words : amoxicillin, ampicillin, biosurfactant, adsorption, aqueous environments.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE ……..... **1**

CHAPITRE I : LES ANTIBIOTIQUES

I.1. Généralités sur les antibiotiques ……..... **3**

I.1.1. Définition ……..……..... **3**

I.1.2. Propriétés physico-chimiques ……..... **3**

I.1.3. Classification ……. **4**

I.1.4. Modes d'action des antibiotiques ……..…… **6**

I.2. Contamination des milieux aquatiques ……..… **6**

I.3. Voies de diffusion des antibiotiques dans l'environnement ……... **8**

I.3.1. Principales voies d'introduction liées à l'usage humain …….. **9**

I.3.2. Principales voies d'introduction liées à l'usage vétérinaire …… **11**

I.3.3. Voies d'introductions communes ……..... **11**

I.4. Impact environnemental des antibiotiques ……..... **12**

I.4.1. Ecotoxicologie …….. **12**

I.4.2. Bioaccumulation ……... **12**

I.4.3. Perturbation endocrinienne ……... **13**

I.4.4. Génotoxicité …….. **13**

I.4.5. Antibiorésistance ……... **13**

I.5. Procédés de traitement des antibiotiques …… **16**

I.5.1. Procèdes biologiques ……... **16**

I.5.2. Procédés physico-chimiques …… **16**

I.5.3. Procèdes d'oxydation avancée ……..... **16**

I.5.4. Ozonation ……..... **17**

I.5.5. Peroxonation (H_2O_2/O_3) …… **17**

I.5.6. Procédés photochimiques …….. **17**

I.5.7. Sonolyse …… **19**

I.5.8. Procèdes membranaires …… **20**

I.5.9. Adsorption …… **21**

CHAPITRE II : LES BIOSURFACTANT

II.1. Définition ……... **22**

II.2. Structure ……. **22**

II.3. Classification ……..... **23**

II.4. Synthèse des biosurfactants ……... **24**

II.5. Paramètres influençant la production …… **25**

II.5.1. Influence de la source de carbone …… **25**

II.5.2. Influence de la source d'azote ……..... **25**

II.5.3. Influence du pH ……... **26**

II.5.4. Influence des sels minéraux ……. **26**

II.5.5. Influence de l'oxygène …… **26**

II.5.6. Influence de la vitesse d'agitation ……... **26**

II.6. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance …….. **26**

II.7. Identification des biosurfactants …… **27**

II.8. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants ……..... **27**

II.8.1. Micellisation …… **27**

II.8.2.Concentration Micellaire Critique (CMC) …… **28**

II.8.3. Solubilisation des biosurfactants dans l'eau ……. **29**

II.8.4. Abaissement de la tension superficielle ……... **30**

II.8.5. Abaissement de la tension interfaciale …… **30**

II.8.6. Propriétés moussantes ……..... **30**

II.9. Potentiels des biosurfactants ……..... **30**

II.10. Toxicité et biodégradabilité ……. **31**

II.11. Différentes applications des biosurfactants **...**……... **32**

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. Objectif ……. **34**

III.2. Matériels et Produits ……..... **34**

III.3. Procédure expérimentale ……..... **37**

III.3.1. Détermination de la CMC du biosurfactant …….. **37**

III.3.2. Caractérisation des antibiotiques par UV-Visible ……. **37**

III.3.3. Elimination des antibiotiques …… **39**

III.3.3.1. Utilisation des tensioactifs classiques ……..……... **39**

III.3.3.2 Utilisation du biosurfactant ……..... **39**
III.3.3.2.1. Etude par UV-Visible ……..... **39**
III.3.3.2.2. Etude par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) …….. **41**
III.4. Présentation des résultats ……..... **43**
III.4.1. Détermination de la CMC ……..... **43**
III.4.2. Caractérisation des antibiotiques par UV-Visible …… **44**
III.4.3. Elimination des antibiotiques au moyen de tensioactifs classique ..……..... **46**
III.4.3.1. Utilisation du tensioactif cationique (CTAB) ……...…… **46**
III.4.3.2. Utilisation du tensioactif non ionique (Tween 80) …..……... **47**
III.4.3.3. Utilisation du tensioactif anionique (SDS) ...…….. **48**
III.4.4. Utilisation du biosurfactant pour le traitement des milieux simples …… **50**
III.4.4.1.Etude de l'établissement de l'équilibre ...……..... **50**
III.4.4.2. Etude de l'influence de quelques paramètres sur l'élimination de l'amoxicilline et l'ampicilline par biosurfactant ……..... **52**
III.4.4.2.1 Effet de l'agitation …… **53**
III.4.4.2.2. Effet de concentration d'antibiotique ……..... **57**
III.4.4.2.3. Effet de la concentration en biosurfactant ……... **61**
III.4.4.2.4. Effet de la salinité …… **66**
III.4.4.2.5. Effet du pH ……..... **71**
III.4.4.2.6. Effet de la température …… **76**
III.4.5. Modélisation des cinétiques d'adsorption …… **81**
III.4.6. Utilisation du biosurfactant pour le traitement des milieux complexes …… **86**
Conclusion générale …….. **90**

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES FIGURES

Chapitre I : LES ANTIBIOTIQUES

Figure I.1 : Structure moléculaire des β-lactamines ……. **5**

Figure I.2 : Origines et principales voies d'introduction des résidus de médicaments dans le milieu aquatique …… **9**

Figure I.3 : plages de concentrations auxquelles les principales classes thérapeutiques peuvent être retrouvées dans les rejets hospitaliers ……. **10**

Figure I.4 : Flux des gènes de résistance dans différents écosystèmes …… **15**

Chapitre II : LES BIOSURFACTANTS

Figure II.1 : structure d'une molécule amphiphile …….. **22**

Figure II.2 : représentations schématiques d'une micelle de surfactant …….. **27**

Figure II.3 : Concentration micellaire critique ……. **28**

Figure II.4 : Diagramme de phases du système eau-tensioactif ionique …….. **29**

Figure II.5 : Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel **33**

Chapitre III : PARTIE EXPERIMENTALE

Figure III.1 : spectrophotomètre UV-visible utilisé ……... **38**

Figure III.2 : Chromatographe utilisé durant les analyses HPLC …… **40**

Figure III.3 : Variation de conductivité en fonction de concentration du biosurfactant.. **44**

Figure III.4 : courbe d'étalonnage de l'amoxicilline ……... **45**

Figure III.5 : courbe d'étalonnage de l'ampicilline ……. **45**

Figure III.6 : concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminés par CTAB ……. **46**

Figure III.7 : pourcentages de rétentions d'antibiotiques par CTAB …….. **47**

Figure III.8 : concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par Tween 80 …….. **48**

Figure III.9 : pourcentages de rétentions d'antibiotiques par Tween 80 ……. **48**

Figure III.10 : concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par SDS ……. **49**

Figure III.11 : pourcentages de rétentions d'antibiotiques par SDS …… **49**

Figure III.12 : Concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par biosurfactant .. **51**

Figure III.13 : pourcentages de rétention des antibiotiques par le biosurfactant ……. **51**

Figure III.14 : effet d'agitation sur la concentration résiduelle de l'amoxicilline …….. **53**

Figure III.15 : effet d'agitation sur le pourcentage de rétention d'amoxicilline …….. **53**
Figure III.16 : effet d'agitation sur la concentration résiduelle de l'ampicilline ……. **55**
Figure III.17 : effet d'agitation sur le pourcentage de rétention d'ampicilline …… **55**
Figure III.18 : Rendement de l'adsorption des antibiotiques en fonction de la vitesse d'agitation …….. **56**
Figure III.19 : effet de la concentration initiale d'amoxicilline sur sa concentration résiduelle ……... **57**
Figure III.20 : effet de la concentration initiale d'amoxicilline sur le pourcentage de sa rétention ……. **58**
Figure III.21 : effet de la concentration initiale d'ampicilline sur sa concentration résiduelle ……... **59**
Figure III.22 : effet de la concentration initiale d'ampicilline sur le pourcentage d'élimination ……. **60**
Figure III.23 : Rendement de l'adsorption des antibiotiques en fonction des concentrations initiales …….. **61**
Figure III.24 : effet de la concentration en biosurfactant sur l'élimination d'amoxicilline …… **62**
Figure III.25 : effet de la concentration en biosurfactant sur le pourcentage de rétention de l'amoxicilline ……. **63**
Figure III.26 : effet de la concentration en biosurfactant sur l'élimination d'ampicilline **64**
Figure III.27 : effet de la concentration en biosurfactant sur le pourcentage de rétention de l'ampicilline ……... **65**
Figure III.28 : Rendement de l'adsorption des antibiotiques en fonction de la concentration en biosurfactant ……... **66**
Figure III.29 : effet de la salinité sur la concentration résiduelle d'amoxicilline …… **67**
Figure III.30 : effet de la salinité sur le pourcentage de rétention de l'amoxicilline ….. **68**
Figure III.31 : effet de la salinité sur la concentration résiduelle d'amoxicilline …… **69**
Figure III.32 : effet de la salinité sur le pourcentage de rétention de l'ampicilline ……. **70**
Figure III.33 : Rendement de l'adsorption des antibiotiques en fonction du sel ajouté .. **71**
Figure III.34 : effet du pH sur la concentration résiduelle d'amoxicilline …….. **72**
Figure III.35 : effet du pH sur le pourcentage de rétention de l'amoxicilline ……. **73**
Figure III.36 : effet de pH sur la concentration résiduelle de l'ampicilline ……. **74**
Figure III.37 : effet de pH sur le pourcentage de rétention de l'ampicilline ……... **75**

Figure III.38 : pourcentages de rétentions maximales à différentes pH …….. **76**
Figure III.39 : effet de la température sur la concentration résiduelle d'amoxicilline … **77**
Figure III.40 : effet du pH sur le pourcentage de rétention de l'amoxicilline ……. **77**
Figure III.41 : effet de la température sur la concentration résiduelle d'ampicilline ….. **79**
Figure III.42 : effet de la température sur le pourcentage de rétention de l'ampicilline.. **80**
Figure III.43 : pourcentages de rétentions maximales à différentes températures …….. **80**
Figure III. 44 : linéarisation du modèle du pseudo premier ordre ……... **82**
Figure III.45 : linéarisation du modèle du pseudo second ordre ……. **83**
Figure III.46 : linéarisation du modèle d'Elovich …… **84**
Figure III.47 : linéarisation du modèle de modèle de diffusion intra particule ……... **85**
Figure III.48. Concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant **87**
Figure III.49. Pourcentage de rétention d'antibiotiques éliminés par le biosurfactant … **87**
Figure III.50. Concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant **88**
Figure III.51. Pourcentage de rétention d'antibiotiques éliminés par le biosurfactant … **89**

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I : LES ANTIBIOTIQUES

Tableau I.1. Caractéristiques physico-chimiques de quelques antibiotiques et leurs persistances dans l'environnement ……... **4**

Tableau I.2. Mécanismes d'action des principales familles d'antibiotiques ……... **6**

Tableau I.3. exemples de concentrations des antibiotiques mesuré dans les milieux aquatiques ……. **7**

Chapitre II : LES BIOSURFACTANTS

Tableau II.1. Source microbienne et principaux types de biosurfactants ……... **24**

Tableau II.2. Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques **....** **32**

Chapitre III : PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau III.1. Conductivité en fonction de la concentration du biosurfactant …… **43**

Tableau III.2. Absorbances de l'amoxicilline à λ= 272 et de l'ampicilline à λ= 264 …. **44**

Tableau III.3. résultats de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage ……... **45**

Tableau III.4. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par CTAB ……. **46**

Tableau III.5. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par Tween 80 …… **47**

Tableau III.6. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par SDS ……. **49**

Tableau III.7. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant ……... **50**

Tableau III.8. Concentrations résiduelles de l'amoxicilline à différentes vitesses d'agitation ……. **52**

Tableau III.9. pourcentages de rétention de l'amoxicilline à différentes vitesses d'agitation ……. **53**

Tableau III.10. Concentrations résiduelles de l'ampicilline à différentes vitesses d'agitation ……. **54**

Tableau III.11. Pourcentages de rétention de l'ampicilline à différentes vitesses d'agitation ……. **55**

Tableau III.12. Concentrations résiduelles à différentes concentrations initiales d'amoxicilline ……... **57**
Tableau III.13. Pourcentages de rétention à différentes concentrations initiales d'amoxicilline ……... **58**
Tableau III.14. Concentrations résiduelles à différentes concentrations initiales d'ampicilline ……
Tableau III.15. Pourcentage de rétention à différentes concentrations initiales **59**
d'ampicilline …….
Tableau III.16. Concentrations résiduelles de l'amoxicilline à différentes **60**
concentrations de biosurfactant ……
Tableau III.17. Pourcentages de rétention de l'amoxicilline à différentes **62**
concentrations de biosurfactant ……
Tableau III.18. Concentrations résiduelles d'ampicilline à différentes concentrations **63**
de biosurfactant …….
Tableau III.19. Pourcentage de rétention d'ampicilline à différentes concentrations de **64**
biosurfactant …….
Tableau III.20. Concentrations résiduelles de l'amoxicilline en présence des sels …… **65**
Tableau III.21. pourcentage de rétentions de l'amoxicilline en présence des sels ……. **67**
Tableau III.22. Concentrations résiduelles de l'ampicilline en présence des sels …….. **68**
Tableau III.23. pourcentage de rétention de l'ampicilline en présence des sels ……. **69**
Tableau III.24. Concentrations résiduelles de l'amoxicilline à différents pH …… **70**
Tableau III.25. Pourcentages d'élimination de l'amoxicilline à différents pH ……... **72**
Tableau III.26. Concentrations résiduelles de l'ampicilline à différents pH …….. **73**
Tableau III.27. Pourcentages d'élimination de l'ampicilline à différents pH ……. **74**
Tableau III.28. Concentrations résiduelles de l'amoxicilline à différents températures **75**
Tableau III.29. Pourcentages d'élimination de l'amoxicilline à différents températures **76**
Tableau III.30. Concentrations résiduelles de l'ampicilline à différents températures .. **77**
Tableau III.31. Pourcentages d'élimination de l'ampicilline à différents températures . **78**
Tableau III.32. Résultats de la régression linéaire du modèle du pseudo premier ordrre **79**
Tableau III.33. Résultats de la régression linéaire du modèle du pseudo second ordre **82**
Tableau III.34. Résultats de la régression de la linéarisation du modèle d'Elovich ….. **83**
Tableau III.35. Résultats de la linéairisation du modèle de diffusion intra particule **….** **84**

Tableau III.36. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant …….. **86**

Tableau III.33. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant …….. **88**

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

BCF : Facteur de Bioconcentration

C/N : Rapport Carbone/ Azote

CE50 : Concentration Effective à 0%

CL50 : Concentration Létale médiane

CMC : Concentration Micellaire Critiques

DCO : Demande Chimique en Oxygène

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HPLC : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance

IR : Infrarouge

POA : Procédés d'Oxydation Avancée

RMN : la Résonance Magnétique Nucléaire

STEP : Station d'Epuration des Eaux Polluées

UV : Ultraviolet

LISTE DES NOMENCLATURES

symbole	Signification	unité
Λ	longueur d'onde	(nm)
E	coefficient spécifique d'absorption	($l.cm^{-1}.g^{-1}$)
A	Aire du pic	
C	Concentration	(mg/l)
DO	Densité Optique	
K_d	coefficient de partage phase particulaire/ phase dissoute	($L.kg^{-1}$)
K_{oc}	*coefficient* de partage carbone organique/eau	($L.kg^{-1}$)
pH	potentiel d'Hydrogène	
pK_a	constante d'acidité	
R	Pourcentage de rétention	**(%)**
T	Titre de solution	**(%)**
T_k	Température de Krafft	(°C)
C_r	concentration résiduelle	(mg/l)
C_0	concentration initiale	(mg/l)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis les années 80 et grâce, notamment, aux progrès de l'analyse physico-chimique, de nombreuses molécules pharmaceutiques ont été détectées dans l'environnement. De nombreux travaux ont depuis lors confirmé l'ubiquité des substances médicamenteuses dans les eaux de surface et les eaux souterraines ainsi que dans les effluents et les boues de stations d'épuration urbaines **(Besse 2010)**.

Parmi ces polluants, les antibiotiques méritent une attention particulière. La contamination de l'environnement par ces composés suscite un intérêt croissant du fait de leur persistance à la biodégradation, leur capacité de sélection d'antibiorésistance chez les bactéries, ainsi qu'en raison de leurs effets toxiques sur les organismes non ciblés. Leur action spécifique sur les bactéries peut conduire à un risque de perturbation des cycles biogéochimiques **(Capdeville 2011).**

La problématique se place dans le contexte de la faible potentialité du traitement par les stations d'épurations (STEP) où les résidus des médicaments quittent le plus souvent les STEP presque inchangés. Les procédés conventionnels de traitement d'eau potable (par exemple, la coagulation et la filtration sur sable) se sont montrés inefficaces pour leur élimination **(Kim et al., 2007).**

En plus des procédés de traitement avancés utilisé pour l'élimination de ce type de micropolluants, tels que les procédés membranaire (osmose inverse, nanofiltration, microfiltration, ultrafiltration), les procédés photochimiques et d'oxydation avancées **(Delgado 2009)**, l'adsorption a été signalée comme l'une des technologies les plus prometteuses appliquées pour le traitement des eaux **(Trifi 2012)**.

Grace à leur capacité d'adsorption, les biosurfactants ou tensioactifs biologiques (synthétisées par les microorganismes) sont utilisé pour l'élimination des micropolluants dans les eaux usées. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques mais par leur biodégradabilité, leur faible toxicité vis-à-vis de l'environnement et de la santé humaine, leur compatibilité, leur sélectivité pour une classe de polluant ou une espèce pathogène et pour des milieux extrêmes (variations élevées de température, de pH et de salinité), ils peuvent être envisagés comme remplaçants au surfactants chimiques **(Tazdait 2013)**

Le présent travail a pour objet d'apporter une contribution à la purification des milieux aqueux contaminés par des antibiotiques au moyen d'un biosurfactant. A cet effet, nous avons étudié l'efficacité du biosurfactant synthétisé localement, pour l'élimination de l'antibiotique amoxicilline présent en milieu aqueux. Les principaux paramètres influençant le rendement du traitement ont été étudiés, à savoir le temps de contact, la vitesse d'agitation, la concentration de l'antibiotique, la concentration du biosurfactant, la température, le pH et la présence des sels. Pour s'approcher aux milieux aquatiques réels.

s, l'étude été accomplis par des tests sur un milieu complexe contenant les deux antibiotiques amoxicilline et ampicilline.

Ce mémoire se subdivise en trois chapitres :

- Dans le premier chapitre, on présente les antibiotiques et la problématique liée à leur présence dans l'environnement aqueux en mettant l'accent sur les risques potentiels associés à ces contaminants, ainsi que les procédés utilisés pour leur élimination.
- Le deuxième chapitre présente une synthèse bibliographique sur les biosurfactants.
- Dans le troisième chapitre de ce manuscrit, on présente, en premier lieu, le matériel et les produits utilisés ainsi que les détails pratiques de la technique expérimentale et les méthodes d'analyse employées. En deuxième lieu, les résultats obtenus sont présentés et discutés.

Le manuscrit est achevé par une conclusion et des perspectives.

I. LES ANTIBIOTIQUES

I.1. Généralités sur les antibiotiques

I.1.1. Définition

Les antibiotiques sont couramment définis comme des substances biologiques (produites par des champignons ou des bactéries) ou synthétiques capables de tuer ou d'inhiber la croissance bactérienne. Ils ont une activité sélective, un site d'action bien défini et un mécanisme précis permettant leur utilisation dans le traitement de la majorité des infections **(Bonot 2010).**

Actuellement, il existe plus de 10000 molécules d'antibiotiques, mais seulement une centaine (dont un quart sont des pénicillines) sont efficaces et utilisables pour des applications thérapeutiques. Les autres sont trop toxiques, trop instables ou ont une biodisponibilité insuffisante chez l'homme. La plupart des antibiotiques sont des molécules naturelles, synthétisées par des procaryotes, des champignons, des végétaux supérieurs, des animaux ou des lichens **(Dinh 2012)**. En se basant sur ces produits naturels, diverses modifications semi-synthétiques ont permis la fabrication de nouveaux antibiotiques de deuxième et troisième génération. Il existe également quelques antibiotiques totalement synthétiques, comme les quinolones et les fluoroquinolones **(Savard 2008).**

I.1.2. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des molécules d'antibiotiques sont déterminantes pour leur devenir dans l'environnement. La solubilité, le coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}), le potentiel d'adsorption et la volatilisation sont les principaux paramètres qui permettent d'évaluer l'exposition potentielle à une substance chimique dans l'environnement (Tableau I.1).

- **Volatilisation** : Les constantes de Henry des antibiotiques sont très faibles, et pratiquement négligeable indiquant que celles-ci sont très peu susceptible d'être volatilisées et cela même à partir d'une solution. Néanmoins, ceci n'exclut pas la possibilité de transfert vers le compartiment atmosphérique à l'état absorbé sur des aérosols particulaires.

- **Hydrosolubilité** : La solubilité des antibiotiques est très variable de l'ordre de quelques mg L^{-1} (acide oxolinique : 4 mgL^{-1}) à quelques centaines de gL^{-1} (norfloxacine : 178 gL^{-1}). Elle n'est toutefois pas définie pour diverses molécules.

- **Liposolubilité** : Les antibiotiques ont généralement des coefficients de partage octanol/eau (LogK_{ow}) inférieurs à 3, seuil à partir duquel on les considère comme substance lipophile et donc potentiellement bioaccumulable.

- **Répartition phase dissoute/particulaire** : Le K_d est le coefficient de partage d'une molécule entre la phase particulaire et la phase dissoute. Plus cette valeur est élevée plus la molécule aura tendance à s'adsorber, et inversement. Des valeurs faibles, traduit un caractère hydrophile avec un risque accru d'infiltration dans sol. Les antibiotiques ont des valeurs de K_d très variables de 0,3 à 6310 L kg^{-1}, donc leurs adsorptions et leurs mobilités sont variables **(Dinh 2012).**

Tableau I.1 : Caractéristiques physico-chimiques de quelques antibiotiques et leurs persistances dans l'environnement (**Dinh 2012**)

Antibiotique	**pK_a**	**Log K_{ow}**	**K_d (L kg^{-1})**	**K_{oc} (L kg^{-1})**	**Solubilité (g L^{-1})**
Tétracycline	3,3 ; 7,3 ; 9,1	-1,2	400 – 620	40.10^3	1,7
Sulfaméthasine	2,7 ; 7,7	0,9	0,6 – 3,1	60 – 208	1,5
Acide oxolinique	6,9	0,7	0,3 – 116	17 – 4510	0,004
Ofloxacine	5,9 ; 8,3	0,4	310	44100	28,3

I.1.3. Classification

Les antibiotiques sont classés en plusieurs familles et ceci selon différents critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action**.** Les principales grandes familles sont les suivantes :

- **Les aminosides ou aminoglycosides** qui sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Ce sont des bactéricides et il en existe plusieurs centaines, naturels ou semi synthétiques.
- **Les phénicolés** de type chloramphénicol et thiamphénicol qui sont des bactériostatiques.
- **Les tétracyclines** sont des bactériostatiques naturels ou semi synthétiques.
- **Les macrolides, lincosamides et synergistines** : les macrolides possèdent un noyau lactone central qui est à la base de leur classification selon le nombre d'atomes de carbone. Les

lincosamides et les synergistines sont associés aux macrolides car elles ont le même mode d'action. Ce sont des bactériostatiques.

- **Les polypeptides** sont des bactéricides décomposés en sept groupes qui se subdivisent en sous-groupes en fonction de leur structure chimique, de l'activité antibactérienne, du mécanisme d'action et de la nature de leur cible cellulaire.

- **Les sulfamides** sont constitués d'un noyau aminobenzène sulfonamide sur lequel se greffe un radical variable qui détermine leur pharmacocinétique, leur durée d'action et/ou leur site d'action.

- **Les quinolones ou fluoroquinolones** ont une structure générale dérivant de l'acidedihydroxy-1,4-oxo-4-quinoléine carboxylique et sont bactéricides. Elles se classent en quinolones de première et deuxième génération selon l'étendue de leur spectre antibactérien et la nature fluorée ou non de leur squelette **(Bonot 2010).**

- **Les β-lactamines :** ils constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leur indication en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, est caractérisée par la présence constante du cycle β-lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables (Figure I.1) qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits. La grande variété de leur mode d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent leur popularité et l'importance de leur utilisation, seules ou en associations **(Mesli 2013)**.

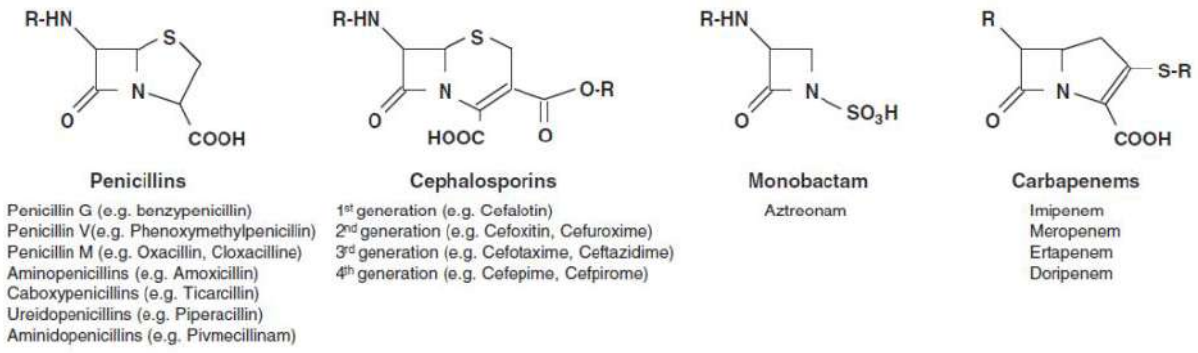


Figure I.1 : Structure moléculaire des β-lactamines **(Chassagne 2012)**

I.1.4. Modes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques ont la capacité de tuer les bactéries ou encore d'inhiber leur croissance, on parle alors respectivement de bactéricide ou de bactériostatique. Afin qu'ils soient efficace et sans danger pour le patient, un antibiotique doit posséder une cible qui soit unique au monde bactérien et absente, ou du moins inaccessible chez le patient. Cette contrainte fait qu'il n'y a que peu de stratégies disponibles pour qu'un antibiotique fonctionne efficacement **(Savard 2008).** Les stratégies les plus exploitées sont résumées ci-dessous (Tableau I.2) :

Tableau I.2 : Mécanismes d'action des principales familles d'antibiotiques **(Savard 2008)**

Mécanisme d'action	**Familles d'antibiotiques**
Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, daptomycines, monobactames, glycopeptides
Inhibition de la synthèse protéique	Tétracyclines, aminoglycosides, oxazolidonones, streptogramines, kétolides, macrolides, lincosamides
Inhibition de la synthèse de l'ADN	Fluoroquinolones
Inhibition compétitive de la synthèse de l'acide folique (folates)	Sulfonamides, triméthoprime
Inhibition de la synthèse de l'ARN	Rifampine

I.2. Contamination des milieux aquatiques

Le rejet en continu de médicaments et de leurs métabolites dans le milieu aquatique conduit à leur accumulation due à leur persistance. De nombreuses études ont montré la présence des résidus d'antibiotiques dans les eaux de surfaces, des eaux souterraines et les effluents de STEP (tableau I.3) (**Dinh 2012**). Cela dépend de leurs propriétés physico-chimiques et en particulier de leur hydrosolubilité, de la stabilité des molécules et de leur demi-vie (**Andreozzi et al., 2003**).

Tableau I.3 : Exemples de concentrations des antibiotiques mesurées dans les milieux aquatiques **(Dinh 2012)**

Familles	Antibiotiques	Effluents de STEP (ng L^{-1})	Eaux de surface (ng L^{-1})	Eaux souterraines (ng L^{-1})
Pénicillines	Pénicillines	>200-	3	-
	Flucloxacilline	-	7	-
	Piperacilline	-	48	-
Macrolides	Tylosine	-	>280-	-
	Erythromycine-H_2O	>6000	>1700	>49
	Roxithromycine	>1000	>560	>26
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	>106	>32[a]	-
	Acide oxolinique	-	-	-
	Fluméquine	-	-	-
	Norfloxacine	-	>120	-
	Ofloxacine	>82	-	-
Sulfamides	Sulfaméthoxazole	>2000	>1900	>470
	Sulfaméthozine	-	>220	>160
	Sulfadiazine	-	-	>17
	Sulfaméthazine	-	>7[a]	>23
Tétracyclines	Tétracycline	>20	>110-	-
	Chlorotétracycline	-	>690	-
Diaminopyrimidines	Triméthoprime	>600	>710	-

Plusieurs antibiotiques ont été détectés dans les effluents industriels, certains d'entre eux sont faiblement dégradables par les STEP, comme le sulfaméthoxazole **(Carballa et al., 2007)**. Pour ce dernier, le taux d'élimination dépend du procédé de traitement : il était de 5 à 21% dans une station à boue activée conventionnelle et a augmenté à 80 % dans un bioréacteur à membrane.

Göbel et ses collaborateurs ainsi que Watkinson ses collaborateurs en 2007 ont évalué la dégradation de 28 antibiotiques dans des STEP conventionnelles au charbon actif ainsi que des stations utilisant la microfiltration et l'osmose inverse. Si les teneurs en antibiotiques sont réduites de 92%, ils se trouvent systématiquement dans les premières la ciprofloxacine, le sulfaméthoxazole, la lyncomycine et le triméthoprime à des teneurs de 0.05 à 0.6 µg L^{-1}, alors que dans les secondes, les teneurs varient entre 0.01 et 0.001 ng L^{-1}, ce qui entraine leurs présences.

Pour les eaux de surface, les études ont permis de détecter des traces d'antibiotiques dans 50% des eaux des 139 sites étudiés **(Kolpin *et al*., 2002).**

Dans les eaux souterraines, marines, mais aussi dans les eaux destinées à la consommation humaine, plusieurs antibiotiques et autres médicaments ont été détectés. Récemment, une étude a montré la présence de plusieurs antibiotiques dans les eaux de boisson de quelques à plusieurs ng L^{-1}, ce qui rend le problème très préoccupant **(Rabiet *et al*., 2006; Dirany 2010).**

I.3. Voies de diffusion des antibiotiques dans l'environnement

Les voies d'introduction des résidus des médicaments sont multiples et variées. La source principale concerne les médicaments consommés par l'homme et l'animal. Le devenir du principe actif après excrétion dans les urines et les fèces varie selon l'individu et la molécule. Ainsi, la molécule mère peut être excrétée soit sous forme inchangée ou métabolisée. Les résidus des médicaments sont ensuite, dispersés selon deux axes principaux de dissémination au niveau géographique : les rejets diffus et les rejets ponctuels (figure I.2). Les rejets diffus concernent essentiellement les émissions provenant de l'épandage des boues ou de l'assainissement non collectif tandis que les rejets ponctuels sont relatifs aux voies de contamination comme les stations d'épuration ou les pisciculture**s (Idder 2012).**

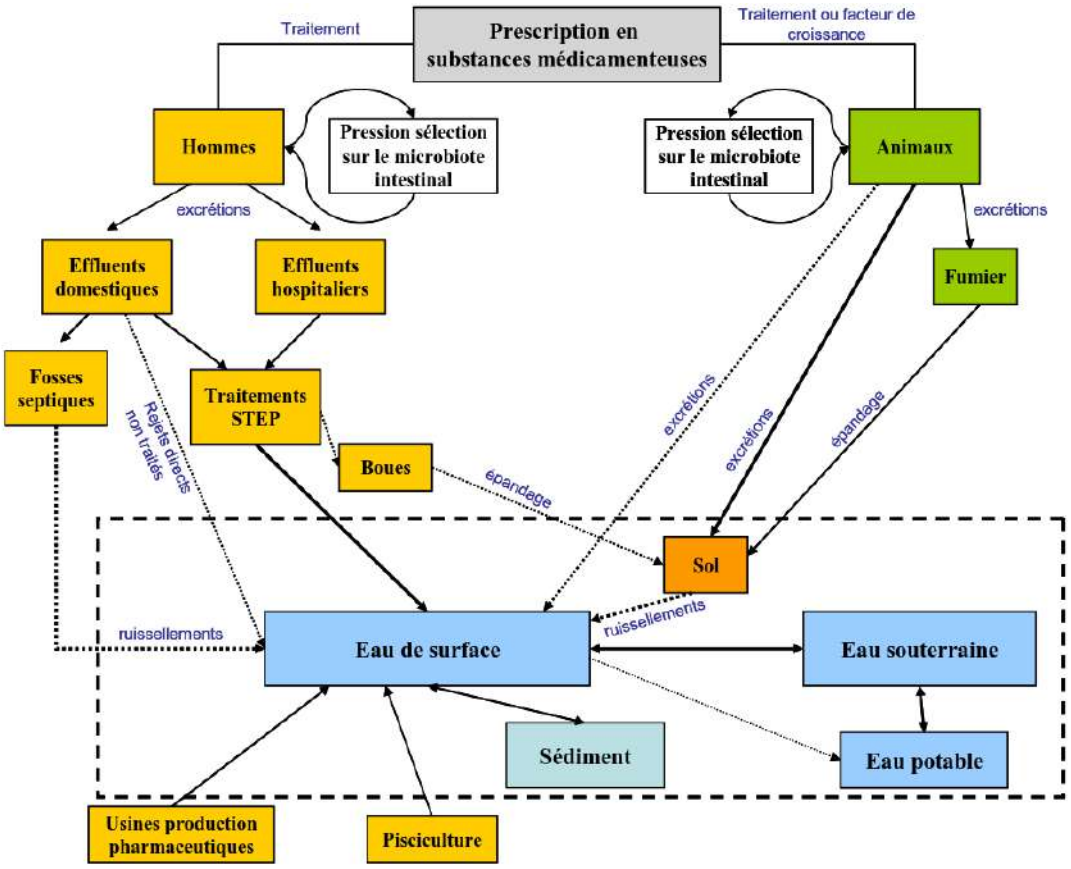


Figure I.2 : Origines et principales voies d'introduction des résidus des médicaments dans le milieu aquatique **(Idder 2012).**

I.3.1. Principales voies d'introduction liées à l'usage humain

- **Les stations d'épuration urbaines**

Les stations d'épuration ont été identifiées comme étant la principale voie d'introduction des résidus des médicaments dans le milieu naturel. L'élimination des résidus des médicaments par les stations d'épuration est très variable **(Miège *et al.*, 2009).** Les techniques d'assainissement peuvent également influencer fortement l'abattement des molécules mais certains composés comme la carbamazépine sont connus pour être réfractaires aux différents procédés classiques utilisés pour le traitement des eaux usées **(Clara *et al.*, 2004).**

L'effet saisonnier de la consommation des médicaments joue un rôle important sur la variabilité des apports de certaines classes de médicaments dans les stations d'épuration comme l'ont montré (**McArdell *et al.*, 2003)**

- **Les centres de soins**

Les centres de soins (hôpitaux, cliniques, etc.) contribuent pleinement à l'apport de résidus des médicaments dans l'environnement. La caractérisation des effluents des établissements de soins a été documentée dans plusieurs publications scientifiques mais elles sont pour la plupart, encore récentes **(Nagarnaik *et al*., 2011 ; Sim *et al*., 2011).**

Les rejets de ces centres, raccordés au réseau d'assainissement collectif ou ayant leur propre système de traitement des eaux usées, présentent des caractéristiques différentes de celles des eaux usées urbaines. En effet, certains traitements thérapeutiques sont utilisés spécifiquement dans ces établissements (figure I.3). C'est le cas, par exemple, de certains antibiotiques comme l'ofloxacine ou le sulfaméthoxazole **(Brown *et al*., 2006).**

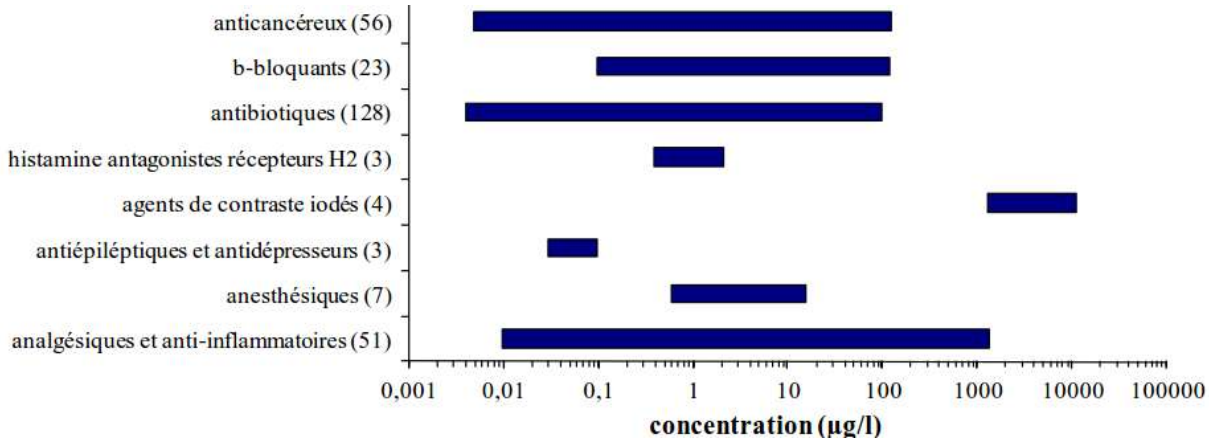


Figure I.3 : Plages de concentrations auxquelles les principales classes thérapeutiques peuvent être retrouvées dans les rejets hospitaliers **(Capdeville 2011)**

- **L'assainissement non collectif**

Ce système qui peut s'adresser aux maisons individuelles non raccordées au réseau collectif est essentiellement répandu dans les milieux ruraux afin d'éliminer les matières organiques, l'azote et le phosphore. La filière de traitement des eaux est composée de deux étapes : le prétraitement qui est assuré par une fosse septique et l'assainissement qui est effectué dans le sol ou un dispositif agréé. Les eaux sont ensuite évacuées par infiltration dans le sol. Cependant, quand la nature du sol ne permet pas de disperser les eaux usées traitées, le rejet peut se faire dans un milieu aquatique superficiel.

La part de l'assainissement non collectif dans la contamination des compartiments environnementaux a été peu quantifiée jusqu'à présent. Toutefois, quelques travaux ont déjà été publiés sur les résidus de médicaments et les effluents des fosses septiques provenant de

lieux résidentiels ou de lieux publics (campings, parc, commerces, etc.). Ces études mettent en avant le rôle important que peuvent avoir les systèmes d'assainissement non collectifs dans la contamination des eaux souterraines situées à proximité de ces sites. En effet, l'infiltration dans le sol des résidus de médicaments non dégradés peut impacter les eaux souterraines et, in fine, les eaux destinées à la consommation humaine **(Idder 2012).**

I.3.2. Principales voies d'introduction liées à l'usage vétérinaire

Les principales spécialités utilisés en médecine vétérinaire concernent les antibiotiques, les antiparasitaires et les hormones mais les molécules les plus fréquemment recherchées dans le milieu aquatique restent, aujourd'hui, les antibiotiques **(Kolpin et al., 2002 , Sim et al., 2011).**

Les résidus excrétés par les animaux se retrouvent dans les déjections animales et les fumiers et lisiers qui sont stockés puis épandus sur les sols. En fonction des propriétés physicochimiques des résidus de médicaments, ces derniers peuvent être retrouvés dans les eaux souterraines (infiltration) et/ou dans les eaux de surface (ruissellement) **(Kemper 2008).**

L'utilisation d'antibiotiques en aquaculture est plus faible que dans l'élevage d'animaux de rente mais l'introduction des résidus de médicaments se fait directement dans le milieu aquatique. Les poissons n'ingèrent pas les médicaments qui leur sont administrés dans leur totalité les principes actifs restant sont soit adsorbés par les sédiments, soit présents dans la phase dissoute **(Thorpe *et al*., 1990).**

I.3.3. Voies d'introduction communes

- **Les unités de production**

De la littérature, les informations traitant les rejets provenant des sites de production des médicaments sont récentes mais parcellaires **(Sim *et al*., 2011).** Il s'agit également d'une voie d'introduction très ciblée puisqu'elle n'implique principalement que les composés produits sur le site mais aussi les zones géographiques où sont situés les sites de production.

Selon la règlementation en vigueur, les rejets en eaux usées des usines de production sont soit traités par la station d'épuration du site, soit raccordés aux stations d'épuration urbaines. Cependant les concentrations de résidus des médicaments sont très élevées dans les effluents industriels dépassant ainsi les teneurs déjà rencontrées dans les réseaux collectifs pour certains antibiotiques **(Idder 2012)**.

- **Les centres de stockage**

Les déchets qui ne sont ni recyclés et ni valorisés sont stockés à défaut d'être incinérés dans des centres de stockage pour y être enfouis. Bien que ces lieux répondent à des normes environnementales strictes, la saturation des sites et certaines conditions exceptionnelles peuvent engendrer une contamination du milieu aquatique par le biais d'infiltration. Très peu d'études ont été menées concernant ce sujet mais cette voie d'introduction n'est pas à négliger **(Looser *et al*., 1999).**

I.4. Impact environnemental des antibiotiques

Les médicaments à usage humain sont des contaminants de l'environnement, au même titre que les pesticides ou les métaux ; mais leurs caractères particulier de produits de santé, ainsi que le bénéfice qu'ils nous apportent en font des composés dont la gestion du risque doit être établie de manière raisonnable et pragmatique : on imagine difficilement à l'heure actuelle le retrait d'une molécule en raison de sa trop forte nocivité pour les écosystèmes. Néanmoins, l'impact des médicaments sur l'environnement ne peut être écarté **(Besse 2010).**

I.4.1. Ecotoxicologie

La présence de résidus des médicaments conçus pour être biologiquement actif, peut provoquer des effets indésirables sur des organismes non cibles présents dans l'environnement. plusieurs approches permettent d'évaluer la toxicité des composés pharmaceutiques vis-à-vis de divers organismes par des tests de toxicité aigüe et chronique sur les trois principaux groupes taxonomiques d'organismes aquatiques (algues, invertébrés, poissons) servant communément de base pour l'évaluation des risques **(Boillot 2008)**. Des tests de toxicité aiguë permettent aussi de montrer de grandes différences selon l'antibiotique et les organismes vivants: l'ofloxacine, par exemple, est particulièrement toxique pour les bactéries, la sulfadiméthoxine l'est pour les invertébrés tandis que la tylosine, la chlorotétracycline et l'érythromycine le sont pour les algues **(Hernando *et al*., 2006).**

I.4.2. Bioaccumulation

Les antibiotiques peuvent se concentrer dans les chaînes trophiques. L'étude de la bioconcentration pour une substance dans un organisme exposé permet de définir le Facteur de Bioconcentration (BCF). Une valeur de BCF > 2000 traduit une aptitude de la molécule à la

bioaccumulation. Si la plupart des antibiotiques ont un BCF autour de 3 (cas de l'amoxicilline et de l'oxytétracycline dans *Microcystisaeruginosa*), d'autres comme l'érythromycine, ont une capacité de bioconcentration plus élevée avec un BCF de 45,3 dans les organismes **(Jones *et al.*, 2002; Dinh 2012)**

I.4.3. Perturbation endocrinienne

Certains résidus des médicaments ont la faculté d'agir sur le système hormonal des êtres vivants. C'est le cas des hormones ostrogéniques. L'observation de la faune aquatique a montré que les poissons étaient soumis à une perturbation endocrinienne. De plus, des expérimentations réalisées sur des poissons en cage ont menée au même constat **(Idder 2012)**

I.4.4. Génotoxicité

La génotoxicité traduit la capacité d'un composé à modifier l'ADN. Les anticancéreux, molécules génotoxiques par excellence, peuvent potentiellement conduire à la mutation de gènes d'organismes non cibles. Les eaux usées provenant des stations d'épuration en sont un vecteur privilégié puisqu'ils ont déjà été retrouvés dans différents effluents ont mesuré l'activité génotoxique de 800 échantillons d'eaux résiduaires provenant d'un hôpital. Sur l'ensemble, 13 % des échantillons ont été considérés comme génotoxiques **(Idder 2012).**

I.4.5. Antibiorésistance

Un danger spécifique aux antibiotiques est à noter que ce soit en santé humaine ou du point de vue environnemental. Il s'agit des phénomènes de résistances bactériennes aux antibiotiques. Ces phénomènes ont pour conséquence la difficulté à traiter et à guérir certaines maladies jusqu'ici facilement soignables.

La résistance des bactéries aux antibiotiques survient au hasard par des mécanismes qui sont sans doute hérités de la compétition naturelle entre microorganismes. C'est un fait inhérent à leur mode de fonctionnement qui leur permet de s'adapter à leur environnement **(Chassagne 2012).** Certaines bactéries sont résistantes de manière innée, on parle d'une résistance naturelle. D'autres sont initialement sensibles à certains type d'antibiotiques mais y deviennent résistantes suite à des modifications génétiques, on parle de résistance acquise **(Capdeville 2011)**.

I.4.5.1. Causes de la résistance aux antibiotiques

L'utilisation importante des antibiotiques en médecines humaines et animales est considérée comme la raison majeure de l'accroissement de la résistance bactérienne aux antibiotiques, et de la contamination de l'environnement (eau et sol) par les antibiotiques. Dans l'environnement, deux hypothèses pouvaient expliquer l'existence de bactéries résistantes :

- la présence permanente d'antibiotiques, consécutive aux rejets humains (effluents du STEP) ou animaux (épandage lisier/fumier sur les sols agricoles), à des concentrations inférieures aux seuils thérapeutiques.
- le rejet dans le milieu des bactéries résistantes présélectionnées dans les organismes humains ou animaux.

Dans la première hypothèse, la sélection des bactéries résistantes se ferait dans l'environnement alors que dans la deuxième hypothèse, il y a un transfert de gêne porteur de résistance entre des bactéries d'origine fécale (humaine ou animale) et des bactéries uniquement présentes dans le milieu naturel **(Capdeville 2011).**

L'environnement joue également un rôle dans la diffusion de la résistance ; les antibiotiques utilisés en agriculture, en pisciculture ou encore en arboriculture, sont retrouvés sous forme native ou métabolisés dans les sols et les eaux où ils maintiennent une pression de sélection. Les techniques d'épandage de fumier ou lisier, voire de boues de stations d'épuration, entretiennent ce phénomène. Les effluents et les stations d'épuration (STEP) sont d'ailleurs considérés comme de véritables «hot-spots» qui favorisent les échanges horizontaux de matériels génétiques (figure I. 6) en raison de concentrations bactériennes importantes, de la présence des bactéries d'origine différentes (humaines, animales, environnementales), dans un environnement riche en matières organiques, et en présence de centaines de molécules d'antibiotiques ou de leurs métabolites **(Barraud 2011).**

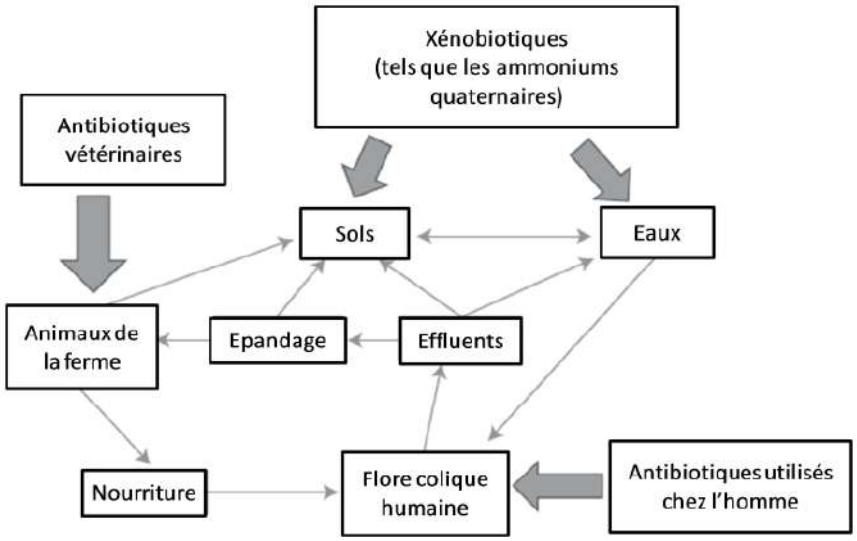


Figure I.4 : Flux des gènes de résistance dans différents écosystèmes **(Barraud 2011).**

I.4.5.2. Impact de l'antibiorésistance

La présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement, et en particulier dans les eaux, représente un danger sanitaire et écologique. En effet, du point de vue sanitaire, l'homme est exposé à ces bactéries résistantes soit de façon directe lorsqu'elles survivent aux traitements de potabilisation et qu'elles sont consommées avec les eaux de boisson ou lorsqu'elles ont remonté la chaîne alimentaire jusqu'aux coquillages filtreurs consommés par les hommes, comme les moules par exemple, soit de façon indirecte lorsqu'elles sont dans les eaux récréatives comme les eaux de baignades.

Du point de vue environnemental, un premier risque est lié à la dissémination de gène de résistance au sein des communautés microbiennes. Le deuxième risque écologique est lié aux perturbations des communautés microbiennes autochtones impliquées dans les cycles biogéochimiques (**Capdeville 2011).**

Bien que la résistance puisse apparaître très rapidement, elle disparait malheureusement très lentement, même en l'absence d'antibiotique, indiquant le coût minime à payer par la bactérie pour en bénéficier. Il est donc extrêmement important que la recherche dans le domaine de la résistance aux antibiotiques se poursuive afin d'être en mesure de mieux faire face à cet inévitable fléau et d'améliorer nos conditions de santé **(Savard 2008).**

I.5. Procédés de traitement des antibiotiques

I.5.1. Procèdes biologiques

Les procédés d'épuration par voies biologiques sont communément utilisés pour le traitement des produits pharmaceutiques. Ces procédés ne sont pas toujours applicables sur les effluents industriels en raison des fortes concentrations de polluants, de la toxicité ou de la très faible biodégradabilité. Dans le cas des produits pharmaceutiques non favorables au traitement biologique, il est nécessaire d'utiliser des réactifs beaucoup plus efficaces que ceux adoptés dans les procédés de purification conventionnels. De plus, ces procédés biologiques génèrent des quantités importantes de boues biologiques à traiter **(Dirany 2010).**

Il a été rapporté que les β-lactames peuvent être significativement réduits durant le traitement biologique avec un taux d'élimination dépassant les 90% **(Li et Zhang 2011).**

I.5.2. Procédés physico-chimiques

Les procédés physico-chimiques classiques tels que la coagulation, la floculation, le processus de précipitation sont jugés inefficaces pour éliminer ce type de contaminants organiques en phase dissoute **(Ternes *et al.*, 2002)** Les procédés conventionnels de traitement d'eau potable (par exemple, la coagulation et la filtration sur sable) ont été évalués par **Kim *et al.*, 2007.** Ils affirment que ces procédés se sont montrés inefficaces pour l'élimination de micropolluants dans l'eau de source.

I.5.3. Procèdes d'oxydation avancée

Les procédés d'oxydation avancée sont définis comme des procédés de traitement des eaux fonctionnant à température et pression ambiante, et qui impliquent la génération d'un oxydant secondaire plus puissant à partir d'un oxydant primaire **(Abouzlam 2004).** Ces procédés consistent à la formation «in situ» de radicaux hautement réactifs (radical hydroxyle OH• en particulier), en quantité suffisante pour assurer la purification de l'eau. L'oxydation des polluants les transforme de façon ultime en dioxyde de carbone, eau et composées minéraux, ou au moins conduit à des produits intermédiaires le plus souvent inoffensifs (acides carboxyliques) **(Velickova 2014).**

Plusieurs études ont montré l'efficacité de ces procédés pour l'élimination des antibiotiques à partir des eaux usées **(Naddeo *et al.*, 2009 ; El molla et Chaudhuri,2011).**

I.5.4. Ozonation

L'ozone, oxydant puissant relativement instable dans l'eau, se décompose rapidement en dioxygène et en oxygène atomique il doit être produit impérativement sur le site avant son utilisation grâce à l'émission d'une charge électrique sous haute tension sous un air sec. Sous une atmosphère humide, l'atome d'oxygène réagit avec l'eau pour former des radicaux hydroxyles. En phase aqueuse, l'oxygène se recombine pour produire du peroxyde d'hydrogène. L'ozone dégrade les substances organiques dissoutes par attaque électrophile très sélective sur les liaisons instantanées des alcènes et des composés aromatiques ou par réaction indirecte des radicaux libres **(Merouani 2011).**

L'étude menée par **(Hollender *et al.*, 2009)** fut observer qu'en utilisant l'ozone à une dose de 2 mg L^{-1} (0.3-0.4gg^{-1} DCO) plus que 80% des sulfonamides, trimethoprime et macrolides ont été éliminé à partir des eaux usées. Les travaux de (**Balcıoglu et Otker 2003)** sur des B-lactames ont montré que le taux d'élimination était de 80% après 60 min de traitement par ozonation avec une dose de 2.96 g $L^{-1}h^{-1}$.

I.5.5. Peroxonation (H_2O_2/O_3)

Les radicaux hydroxyles, principaux oxydants de la peroxonation, sont formés par la réaction entre l'ozone et le peroxyde d'hydrogène :

Même si ce procédé est plus efficace que l'ozonation grâce à la formation de radicaux hydroxyles, son efficacité est limitée par la vitesse de réaction entre O_3 et H_2O_2. Ce système est affecté par les mêmes contraintes que l'ozonation, à savoir, la faible solubilité de O_3, les réactions parasites consommant les OH• et le type de polluant. En revanche, l'ozonation et la peroxonation présentent l'avantage, par rapport aux procédés photochimiques (irradiation UV), de fonctionner dans une eau de forte turbidité, car le système ne dépend pas de la transmission des rayonnements dans l'effluent **(Dirany 2010).**

I.5.6. Procédés photochimiques

La dégradation des micropolluants organiques est possible à travers divers procédés photochimiques qui nécessite une source artificielle de rayonnement ou l'irradiation par des rayonnements solaires. Le rendement de dégradation par des POA photochimiques peut être nettement amélioré en utilisant la photocatalyse homogène ou hétérogène. Les procédés homogènes (photolyse de H_2O_2, photo-Fenton, etc.) se déroulent en milieu homogène, contrairement aux procédés hétérogènes qui emploient des semi-conducteurs tels que TiO_2, ZnO, etc…Pour la catalyse (**Haddou 2010).**

- **Oxydation Fenton**

Ce procédé a été découvert au dernier siècle par Henry John Horstman Fenton mais fait encore l'objet d'un grand nombre de recherches dans le domaine du traitement des eaux. C'est un procédé d'oxydation très simple produisant des radicaux hydroxyles à partir d'H_2O_2 et de Fe^{2+} **(Chennini 2007).**

- **Procédé Photo-Fenton**

Le procédé photo-Fenton s'appuie sur la réaction de Fenton entre H_2O_2 (agent oxydant) et Fe^{2+} (catalyseur) couplé à l'irradiation UV/ visible pour le traitement des eaux usées. L'irradiation UV/ visible augmente considérablement la vitesse de formation des radicaux HO• par réaction de Fenton d'une part, réduction du fer ferrique et photolyse du peroxyde d'hydrogène d'autre part, mais sa contribution à la méthode photo-Fenton est négligeable car H_2O_2 absorbe peu ces radiations. L'efficacité du traitement photo-Fenton dépend essentiellement des concentrations en ions Fe^{3+} et H_2O_2 et évidemment de l'intensité lumineuse. Des études ont montré que la dégradation de l'amoxicilline n'est pas influencée par la source de leur rayonnement pendant le processus photo Fenton et le taux d'élimination des antibiotiques était de 89 et 85% sous la lumière noire et l'irradiation solaire. D'autre part la tétracycline a été éliminé jusqu'à 80% pendant le traitement photo-Fenton en utilisant deux types fer de et d'irradiation (**Chenini 2007).**

- **Photolyse**

Les polluants organiques peuvent être dissociés par excitation UV directe (λ<250nm). Pour ce faire, les polluants doivent avoir une forte absorption pour la lumière d'excitation et un rendement quantique suffisant. Le composé oxydé par la photo excitation initiale réagit avec le dioxygène dissous dans l'eau avant d'être transformé en sous-produits. Le traitement des polluants organiques par photolyse direct et rapidement été abandonné pour de nombreuses raisons incluant les coûts très élevés de fonctionnement, la faible fiabilité du matériel et les problèmes de maintenance **(Cheninni 2007).**

Plusieurs études ont montré l'efficacité de traitement par irradiation UV pour l'élimination des antibiotiques à partir des eaux usées **(Yuan *et al.*, 2011).** Ils ont reporté qu'à des doses élevées d'UV, une élimination complète de tétracyclines et ciprofloxacine a été atteinte.

Kim et ses collaborateurs en 2009 ont indiqué que les sulfonamides (sulfaméthoxazole et sulfadiméthoxine) et les quinolones (norfloxacin et nalidixicacid) ont été efficacement éliminés à des taux de 86% et 100% durant le processus UV.

- **Photolyse de H_2O_2**

Des longueurs d'onde UV allant de 200 à 280 nm (λmax étant égale à 260 nm) provoquent la décomposition de H_2O_2, ce qui génère des radicaux hydroxyles, avec un rendement quantique de deux •OH formés par photon absorbé (Legrini *et al*., 1993; Venkatadri et Peters, 1993). Cette production rapide de radicaux •OH permet d'initier des mécanismes radicalaires. Dans un tel système, la voie de dégradation prédominante des contaminants organiques est donc l'oxydation par les radicaux •OH **(Dirany 2010).**

- **Photocatalyse hétérogène (TiO_2/UV)**

La photocatalyse hétérogène est une méthode alternative de traitement des polluants organiques présents dans l'eau. Elle est basée sur le principe de la photo-excitation d'un semi-conducteur (le dioxyde de titane, TiO2) soumis au rayonnement UV artificiel ou solaire, permettant d'initier des réactions radicalaires. Les radicaux qui sont des espèces fortement oxydantes permettent la minéralisation d'un très grand nombre de polluants organiques (**Dirany 2010)**

L'étude de **(El molla et Chaudhuri 2011)** a examiné la possibilité d'utilisation de la photocatalyse TiO_2 combinée (UV/TiO_2/H_2O_2) et le réacteur biologique séquentiel pour le traitement des eaux usées contenant l'amoxiciline et le cloxacilline. L'élimination complète de ses composants a été observée à des doses de TiO_2 et H_2O_2 de 1000 et 250 mg L^{-1}, respectivement. D'autre part, l'amoxicilline a été aussi complètement éliminée à partir des eaux usées domestiques en utilisant $[TiO_2]^{¼}$ 0.8gL^{-1} après 120 min de traitement comme reporté par **(Michael *et al.*, 2012).**

I.5.7. Sonolyse

En milieu aqueux, les ultrasons peuvent agir suivant deux modes d'action, soit par action chimique (indirecte), ou encore par une action physique (directe). L'action indirecte, souvent obtenue à haute fréquence, conduit à la génération de radicaux libres (HO°, HO2° et O°) induite par rupture homolytique de la molécule d'eau ou d'oxygène. L'action directe induite par les ultrasons est également intéressante pour le traitement d'effluents industriels. De nombreuses

études ont montré l'efficacité des procédés d'oxydation sonochimique pour dégrader certains composés organiques présents dans les eaux usées tels que les composés phénoliques **(Zaviska 2011).**

L'évaluation d'un processus ultrasonique sur la dégradation de l'amoxiciline dans les eaux usée a permet constater que la conversion de l'amoxiciline a été renforcée en appliquant des densités de puissances élevées, des conditions acides et en présence de l'air dissous et le taux d'élimination maximum observé était de 40% **(Michael *et al.*, 2012).**

I.5.8. Procèdes membranaires

Les techniques membranaires opérant en milieu liquide et faisant intervenir la pression comme force motrice sont les suivantes

- **Microfiltration (MF)**

Elle peut être définie comme un procédé de séparation solide/liquide. Le mécanisme est basé exclusivement sur l'effet tamis (taille) et rend possible la rétention de particules en suspension ou de bactéries dont la taille se situe entre 0.1 et 10 μm. Les pressions appliquées sont de quelques dixièmes de bar pour éviter un colmatage important **(El Khabbaz 2008)**.

- **Ultrafiltration (UF)**

L'ultrafiltration permet la séparation de macromolécules et d'espèces colloïdales. Le solvant ainsi que les solutés de faible masse molaire traversent la membrane selon un mécanisme convectif sous l'effet de la pression, tandis que les espèces de taille supérieures (colloïdes, protéines, polymères) sont retenues **(El Khabbaz 2008)**.

- **Nanofiltration (NF)**

La nanofiltration est un procédé de séparation membranaire plus récent qui se situe à la transition entre l'osmose inverse et l'ultrafiltration. Comparée à l'osmose inverse, les membranes de nanofiltration possèdent une structure moins dense qui permet d'obtenir des flux de perméation supérieurs pour des pressions inférieures. Ce qui permettra l'obtention d'un perméat moins polluant **(El Khabbaz 2008).**

- **Osmose inverse (OI)**

Ce procédé utilise des membranes denses qui ne laissent passer que le solvant. La séparation solvant–soluté se fait par un mécanisme de solubilisation et diffusion: le solvant s'adsorbe dans la phase membranaire puis diffuse à travers le matériau **(El Khabbaz 2008).**

Diverses études ont montré une élimination de 90% de plusieurs antibiotiques comprenant des quinolones, des sulfonamides, des tétracyclines et triméthoprimes. Une étude sur le traitement des eaux usées d'une usine de production pharmaceutique pour usage vétérinaire a prouvé que des sulfonamides ont été effectivement éliminés par N-F et le RO **(Kosutı'c *et al.*, 2007)**

I.5.9. Adsorption

L'adsorption est le phénomène qui consiste en l'accumulation d'une substance à l'interface entre deux phases (gaz-solides, gaz-liquide, liquide-liquide, solide-solide). Si les conditions énergétiques ou cinétiques permettant aux molécules de se fixer à la surface de la phase adsorbant, il y aura adsorption **(Hamouche 2013)**

L'adsorption peut être un des principaux facteurs influençant l'élimination des polluants organiques dans les stations d'épuration. En conséquence, les propriétés d'adsorption des produits pharmaceutiques sont cruciales pour la compréhension de leur sort et de leur impact sur l'environnement **(Carballa *et al.*, 2007)**

Dans une étude sur le traitement des rejets hospitalier, les macrolides, fluoroquinolones, triméthoprims et les clindamycines ont été bien éliminés, alors que les sulfamethoxazoles et les metronidazole ont été faiblement éliminés (**Delgado 2010).**

II. LES BIOSURFACTANTS

II.1. Définition

Les surfactants sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants). Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures **(Prommachan 2002).**

II.2. Structure

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire (Figure II.1). Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di), le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés **(Desai et Banat, 1997).**

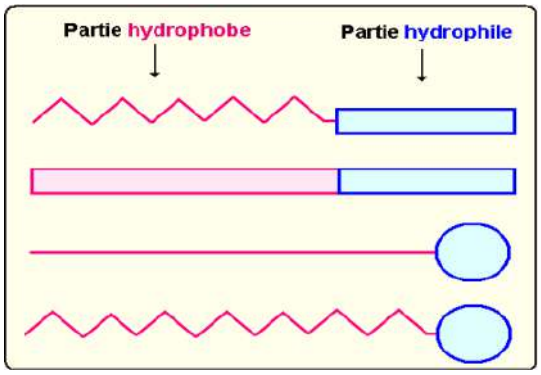


Figure II.1 : Structure d'une molécule amphiphile **(khemili 2008)**

Les biosurfactants peuvent être classés en quatre types selon la partie hydrophile de la molécule :

- les cationiques, qui en solution aqueuse donnent des ions positive,
- les anioniques, qui en solution aqueuse donnent des ions négatives
- les non ioniques, sans charge
- les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre

La partie hydrophobe, quant à elle, influe par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification **(West et Harwell, 1992)**

II.3. Classification

Plusieurs auteurs **(Desai *et al*., 1997, Prommachan 2002)** ont déterminé les classes majeures de biosurfactants et sont différenciés essentiellement par leur composition chimique et leur origine microbienne (Tableau II.1).

- **Les glycolipides :** sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.
- **Les lipopeptides :** sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Les lipides d'ornitine sont les plus connus.
- **Les phospholipides :** sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique.
- **Les lipopolysaccharides :** ou polymériques, sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras**.**
- **Les acides gras et lipides neutres :** sont des biosurfactants qui possèdent une masse molaire très plus élevée.

Tableau II.1 : Source microbienne et principaux types de biosurfactants (**Desai *et al.*, 1997**)

Biosurfactant	Organisme
Glycolipides :	
Rhamnolipides	*Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas sp.*
Trehalolipides	*Rhodococcus erythropolis* *Nocardia erythropolis* *Mycobacterium sp.*
Sophorolipides	*Torulopsis bombicola* *T. apicola* *T. petrophilum* *Ustilago zeae, U.maydis*
Lipopeptides et lipoprotéines	
Peptides-lipides	*Bacillus licheniformis*
Serrawettine	*Serratia marcescens*
Viscosine	*P. fluorescens*
Surfactine	*B. subtilis*
Subtilisine	*B. subtilis*
Gramicidines	*B. brevis*
Polymyxines	*B. polymyxa*
Acide gras, lipides neutres et phospholipides	
Acide gras	*Candida lepus*
lipides neutre	*N. erythropolis*
phospholipides	*Thiobacillus thiooxidans*
Surfactants polymériques	
Emulsane	*Acinétobacter calcoaceticus*
Biodispersane	*A. calcoaceticus*
Mannane-lipide-proteine	*Candida tropicalis*
Liposane	*C. lipolytica*
Hydrates de carbone-proteine-lipide	*P. fluorescens* *Debaryomyces polymorphis*
Proteine PA	*P. aeruginosa*
Biosurfactants particuliers	
Vesicles et fimbriae	*A . calcoaceticus*
La cellule entière	variété de bactéries

II.4. Synthèse des biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, les huiles ou les hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries **(Mata *et al.*, 2000).**

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les HAP. Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs

molécules. Par exemple dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa UG2*, on obtient un mélange de quatre rhamnolipides **(Van dyke *et al*., 1993).**

Les bactéries les plus utilisées dans la production de biosurfactants sont *les Pseudomonas, Rhodococcus, Torulopsis, Bacillus, Nocardia, Serratia et Corynebacterium.* Les tensioactifs biologiques ou biosurfactants possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et efficaces. Dans le cas de micro-organismes extrêmophiles, à des températures, des pH et des salinités extrêmes. Cependant, leurs coûts de production demeurent encore assez élevés et réduit leur utilisation. Les substrats de croissance pour les micro-organismes producteurs de biosurfactants sont peu coûteux, mais le faible taux de production et les procédures de purification font que leurs coûts peuvent être parfois supérieurs à ceux des tensioactifs chimiques **(khemili 2008**).

II.5. Paramètres influençant la production

Le type et la quantité de biosurfactants produits varient avec la composition du milieu (source de carbone ou autres nutriments) et les conditions de culture (température, agitation, pH, etc).

II.5.1. Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. Les sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides. Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles, comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive. En effet, les bactéries ont la capacité de croissance sur des substrats hydrophobes **(Desai et Banat, 1997).**

II.5.2. Influence de la source d'azote

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote est en quantité limitante. La source d'azote peut être apportée sous différentes formes selon la nature des bactéries productrices. Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant **(Gabet 2004).**

II.5.3. Influence du *pH*

Pour une souche de type *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants diminue rapidement. D'autres souches comme *Norcardiacorynbacteroides* sont inaffectées par des pH variant de 6,5 à 8,0 **(Arino *et al*., 1996).**

II.5.4. Influence des sels minéraux

Une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induit une augmentation de production **(Guerra *et al*., 1986).**

II.5.4. Influence de l'oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance **(Gabet 2004).**

II.5.6. Influence de la vitesse d'agitation

Le milieu de culture est agité lors de la production de biosurfactant. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement faible. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures **(Desai et Banat, 1997).**

II.6. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance

Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries du milieu de culture (par centrifugation par exemple). La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules).

Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. **(Desai et Banat, 1997)** ou des techniques reposant sur la précipitation du tensioactif. Les extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices.

Il est possible d'acidifier le milieu puis extraire le tensioactif par un mélange de solvants (chloroforme/méthanol). Généralement, l'acidification permet une précipitation du tensioactif. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif **(Khemili 2008).**

II.7. Identification des biosurfactants

Une fois les produits (biosurfactants) sont purifiés, il faut déterminer leur structure. Parmi les différentes analyses qualitatives on utilise le plus fréquemment

- La spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible (UV-Vis) qui détecte la présence de chromophore.
- La spectrométrie infrarouge (IR) qui détermine les groupements fonctionnels.
- La spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire, des indications sur la structure et qui, à haute résolution, fournit l'analyse élémentaire de la molécule.
- La résonance magnétique nucléaire à haut champs (RMN de proton et de carbone 13) indique la structure et la conformation des composés à analyser **(Djerbaoui 2011).**

II.8. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants

II.8.1. Micellisation

En solution, à faible concentration, un tensioactif se trouve sous forme de monomères, dont une partie est située à l'interface solution-air. L'augmentation de la concentration en tensioactifs engendre une saturation progressive de l'interface. Au-delà de cette saturation, les molécules de monomères s'organisent pour former des agrégats moléculaires appelés micelles, mesurant entre 0,001 et 1µm, afin de minimiser les contacts entre les parties hydrophobes des molécules de tensioactifs et les molécules d'eau (Figure II.2).

La concentration à partir de laquelle les monomères commencent à former ces agrégats est définie comme la concentration micellaire critique (CMC). Le phénomène de micellisation peut être rencontré dans divers solvants, l'eau restant le solvant le plus employé **(Damez 2006).**

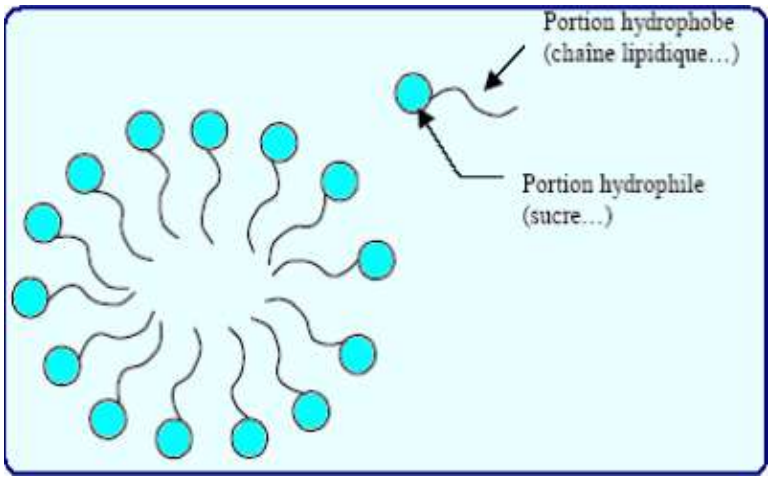


Figure II.2 : Représentation schématique d'une micelle de surfactant **(khemili 2008)**

- **paramètres influençant la micellisation**

Les micelles de biosurfactants se rassemblent en différentes microstructures sphériques, globulaires ou cylindriques, mais des vésicules sphériques et irrégulières, des bicouches tubulaires ou des structures lamellaires sont le plus souvent rencontrées. Le volume intérieur des micelles dépend de la forme des micelles et du nombre d'agrégation (nombre de monomères constituant la micelle). Généralement, il faut de 50 à 100 monomères pour former une micelle. Le nombre d'agrégation augmente quand l'aire de la section transversale de la partie hydrophile diminue **(Christofi et Ivshina, 2002).**

II.8.2. Concentration Micellaire Critique (CMC)

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles (Figure II.3)**.** La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ 30 mN^{-1} en solution aqueuse). Pour de nombreux biosurfactants, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure. Les CMC obtenues pour les biosurfactants varient de 1 à 200 $mg.L^{-1}$ **(Abalos *et al*., 2001).**

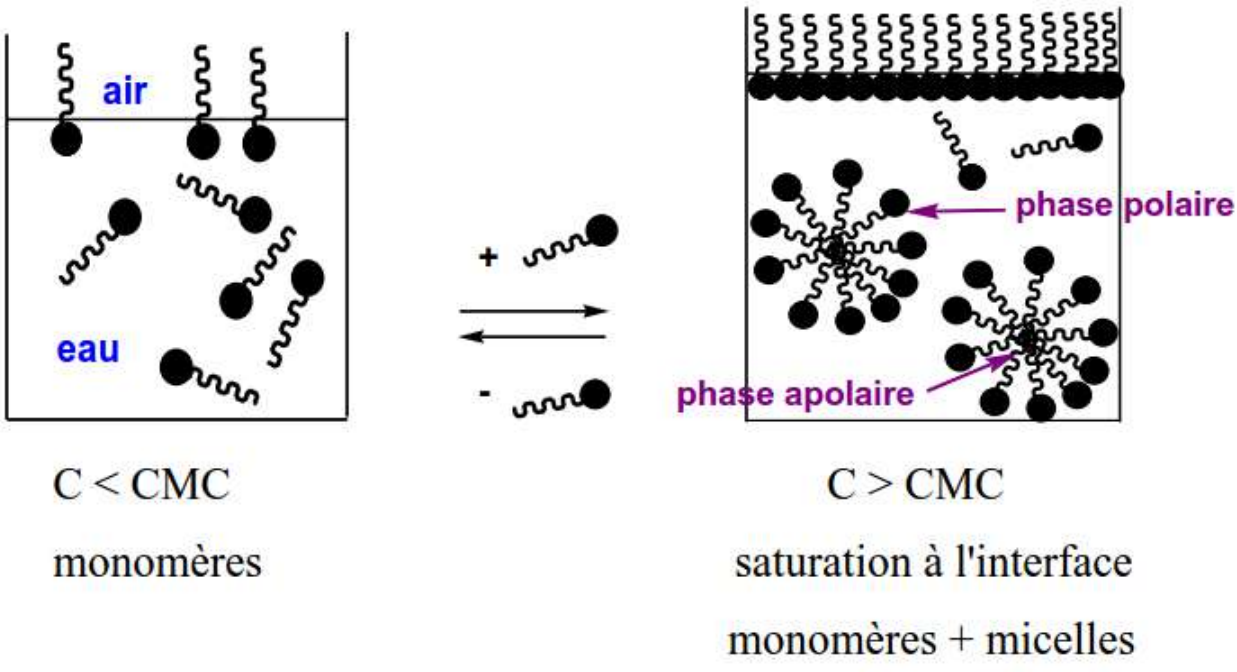


Figure II.3. Concentration micellaire critique **(Abalos *et al*., 2001).**

II.8.3. Solubilisation des biosurfactants dans l'eau

Les agents tensioactifs, au-dessus de leur concentration micellaire critique augmentent de façon significative la solubilité des produits insolubles ou peu solubles dans l'eau. Ce phénomène est appelé "solubilisation". La solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures varie en fonction de l'importance relative de leurs parties hydrophobes et hydrophile (balance hydrophobe/lipophile) et dépend du nombre de laisons C-C présents dans la partie lipophile de la molécule du biosurfactant (**Larpent 2000).**

II.8.3.1. Solubilité des biosurfactants en fonction de la température

Pour les biosurfactants ioniques, la courbe représentant la solubilité en fonction de la température fait apparaître un comportement irrégulier : à partir d'une certaine température Tk, dite température de Krafft, la solubilité augmente brusquement. (Figure II.4). Au dessous du point de Krafft, la solubilité est faible, elle est uniquement due aux monomères présents en solution. Lorsque ces derniers atteignent la saturation (à la CMC), le biosurfactant précipite sous forme de solide hydraté. Au-dessus de Tk, la solubilité croît rapidement avec la température : ceci est lié à la formation de micelles puisque l'activité des micelles reste constante. Ce sont les micelles qui font augmenter la solubilité. Le biosurfactant se retrouve à la fois sous forme de micelles et de monomères. Les biosurfactants non ioniques ne présentent pas de température de Krafft, mais se caractérisent par une température appelée point de trouble **(Gabet, 2004).**

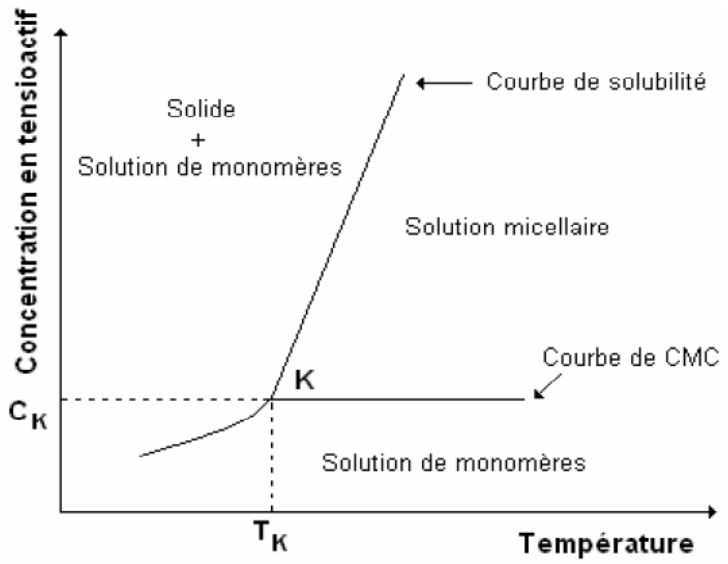


Figure II.4 : Diagramme des phases du système eau-tensioactif ionique **(Nogueira 2005)**

II.8.4. Abaissement de la tension superficielle

La tension superficielle est définie comme étant la force existant à la surface d'un liquide dû à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de la surface **(Holmberg *et al*., 2001)**. La tension superficielle s'exprime en dyne.cm^{-1}.

Les biosurfactants diminuent considérablement la tension superficielle de l'eau, même dans les solutions très diluées. La tension superficielle de l'eau pure est de 72.80 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle peut atteindre approximativement une valeur de 30 mN/m. L'adsorption des biosurfactants et la diminution de la tension superficielle sont responsables de la formation de mousse **(Holmberg *et al*., 2001).**

II.8.5. Abaissement de la tension interfaciale

La tension interfaciale est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles. La tension interfaciale eau-n-octane est de 50.81 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle diminue jusqu'à moins de 1 mN/m **(Holmberg *et al*., 2002)**.

II.8.6. Propriétés moussantes

Les mousses sont des dispersions de gaz dans une phase continue fluide. Elles peuvent être produites par introduction de bulles de gaz dans un liquide (bullage) mais, dans la majorité des cas, les mousses sont formées par battage. La formation des bulles, qui constituent la phase dispersée, engendre l'apparition d'une aire interfaciale importante, avec une tension superficielle élevée qui va tendre immédiatement à faire grossir les bulles, pour minimiser cette aire et donc, réduire l'énergie libre du système. La persistance des bulles n'est possible que si des agents tensioactifs s'adsorbent à l'interface liquide/air et abaissent ainsi la tension interfaciale. La formation de mousse requiert donc la présence d'agents tensioactifs qui s'adsorbent à l'interface eau-air **(Axelos *et al*., 2006).**

II.9. Potentiels des biosurfactants

Les biosurfactants peuvent être efficaces et plus avantageux que les surfactants synthétiques. Ils sont spécifiques, biodégradables, biocompatibles avec l'environnement moins sensibles aux températures, pH et aux salinités extrêmes, moins toxiques et peuvent être synthétisés en grandes quantités, sur des sources d'énergie conventionnelles**,** comme les produits pétroliers, mais aussi sur des ressources renouvelables **(Guergouri 2010).**

Un autre avantage des biosurfactants, est la possibilité de leur modification par biotransformation afin de générer de nouveaux produits pour des besoins spécifiques avec l'introduction de certains groupements fonctionnels, les biosurfactants fournissent de nouvelles propriétés, surpassant ainsi les surfactants chimiques dans beaucoup d'applications **(Huang et al, 2010).**

Ces biomolécules présentent une large gamme de propriétés fonctionnelles qui permettent leur exploitation dans divers domaines **(Prommachan 2002).** Cependant, il n'est pas facile de rationaliser la différence entre leurs rôles naturels et leurs applications. Leur capacité à modifier les propriétés interfaciales et leur auto-assemblage en micelles ou autres nanostructures est cruciale pour plusieurs processus industriels tels que la formation de couches, la diffusion, la formation de mousse, la détergence, la catalyse micellaire, etc. Ces biomolécules peuvent aussi induire la formation d'émulsion, la séparation de phases, la solubilisation, le mouillage, la réduction de viscosité. La floculation, l'agrégation, la désorption ainsi que la stabilisation et la déstabilisation des émulsions **(Guergouri 2010).**

II.10. Toxicité et biodégradabilité

Il existe de nombreux travaux sur la toxicité des surfactants chimiques, mais peu de recherches ont été effectuées sur les biosurfactants. *Edwards et ses collaborateurs en 2003* ont comparé la toxicité de trois surfactants chimiques et biologiques sur deux invertébrés marins (Mysidopsis et Menidia Beryllina). Ces auteurs ont conclu que les biotensioactifs ont des toxicités faibles par rapport à celles des chimiques.

L'émulsan est un biosurfactant de faible toxicité, présente une concentration létale CL50 supérieure à 200 $mg.L^{-1}$. A titre de comparaison, le Triton X100, d'origine chimique et largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique, présente une CL50 de 2,5 à 6 $mg.L^{-1}$. Le Tableau II.2 regroupe quelques valeurs de concentrations effectives et montre qu'en général les biosurfactants sont moins toxiques que leurs analogues chimiques **(Djerbaoui 2011)**

Tableau II.2 : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques **(Christofi et Ivshina, 2002)**

Surfactant	Origine	CE50 ($mg.L^{-1}$)
Rhodoccus ruber AC 235 glcolipide coplexe	Biologique	650
Tréhalose dicorynomycolate de *R. erythropolis*		49
Tréhalose tétraester de *R. erythopolis*		286
Rhamnolipide de *Pseudomonas aeruginosa*		50
Stréarate de sucrose (DK 50)		67
Finasol OSR-5	Chimique	7
Corexit 9597		5
Inipol EAP 22		0.004
CE50 : concentration effective à 0 %, c'est-à-dire affectant 50 % de la population testée.		

II.11. Différentes applications des biosurfactants

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les biosurfactants sont aujourd'hui utilisés dans différents domaines d'applications (Figure II.7) tels que :

- la bioremèdiation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds et dans le traitement des eaux usées l'industrie pétrolière, et particulièrement dans l'amélioration de récupération transport dans les pipelines et dans les opérations de nettoyage des bacs de stockage du pétrole
- l'agriculture, jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation de ces zoospores dans les systèmes de culture sans sol (l'hydroponique)
- l'industrie alimentaire, comme additifs alimentaires, et comme améliorants dans la boulangerie et la charcuterie **(Prommachan, 2002).**
- l'industrie du cosmétique et dans les procédés de teinture du textile
- l'industrie pharmaceutique, comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour combattre les différentes maladies infectieuses

- le secteur de haute technologie comme l'impression électronique, l'enregistrement magnétique, la micro-électronique ainsi que dans les nanotechnologies, tel que la fabrication des nanoparticules d'argent ou les tiges de NiO, etc **(Marquez 2009).**

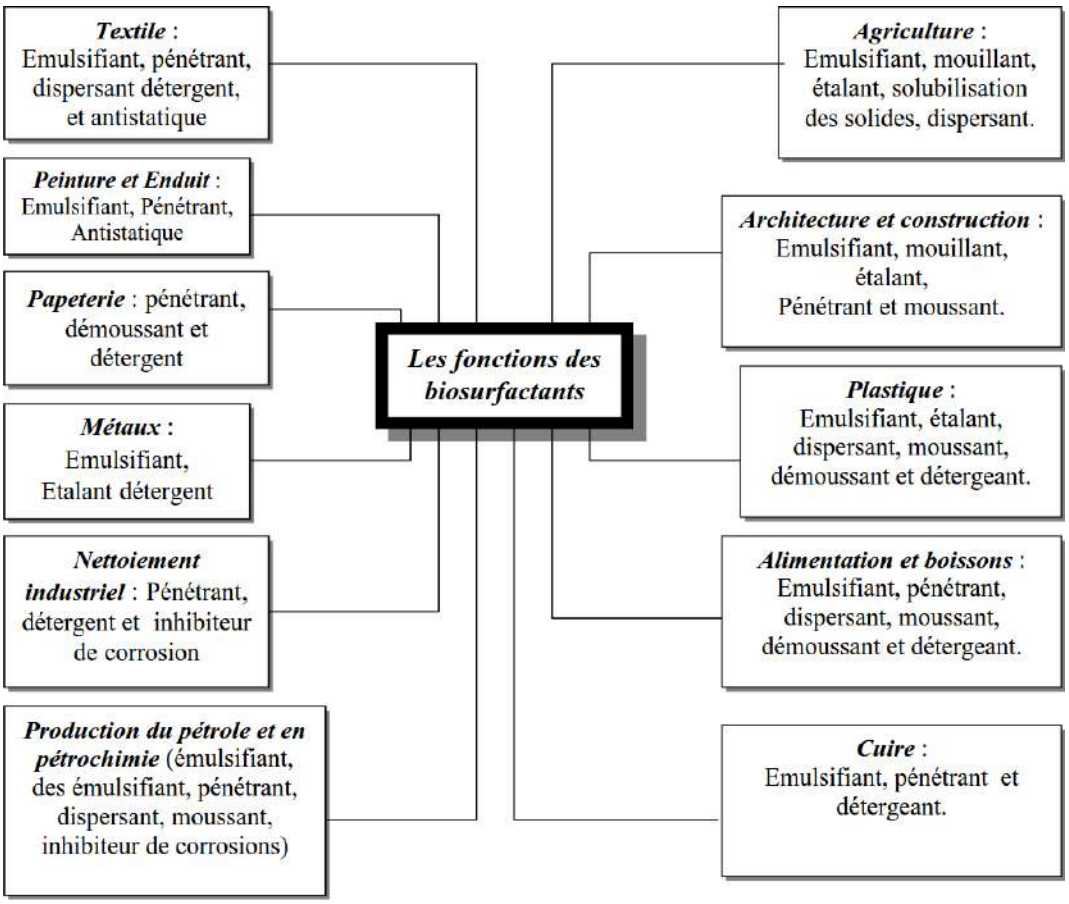


Figure II.5 : Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel **(Khemili 2008).**

III. PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. Objectif

L'objectif assigné à ce chapitre est consacré à la présentation de l'étude expérimentale réalisée. Après avoir présenté les produits, le matériel, et les méthodes d'analyse utilisés, on expose le protocole d'utilisation du biosurfactant pour l'élimination de chacun des deux antibiotiques amoxicilline et ampicilline présent à part en milieu aqueux. On présente par la suite l'étude de l'influence des principaux paramètres physicochimiques sur le rendement du traitement suivie de la modélisation de la cinétique d'adsorption. Pour s'approcher aux milieux aquatiques réels, l'étude a été accomplie par des tests sur un milieu complexe contenant les deux antibiotiques simultanément. Les résultats obtenus sont ainsi présentés et discutés.

III.2 Matériels et Produits

III.2.1. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés lors de cette étude sont :

- **Amoxicilline sodique :** c'est une poudre blanche soluble dans l'eau, de formule chimique $C_{16}H_{19}N_3O_5S$, de masse moléculaire 387,4g/mol, fourni par SAIDAL Antibiotical de MEDEA.
- **Ampicilline sodique :** c'est une poudre blanche soluble dans l'eau, de formule chimique $C_{16}H_{19}N_3O_4S$, de poids moléculaire 371.4g/mol, fourni par SAIDAL Antibiotical de MEDEA.
- **Amoxcilline trihydratée :** c'est une poudre blanche, peu soluble dans l'eau, de formule chimique $C_{16}H_{19}N_3O_5S.3H_2O$, de poids moléculaire 419,4g/mol, et de pureté 851.79 µg/mg. Ce standard de référence 12AP197 est fourni par SAIDAL Antibiotical de MEDEA.
- **Ampicilline trihydraté :** c'est une poudre blanche, peu soluble dans l'eau, de formule chimique $C_{16}H_{19}N_3O_4S,3H2O$, de poids moléculaire 403.5 g/mol, et de pureté 832.11 µg/mg. Ce standard de référence 13AP137 est fourni par SAIDAL Antibiotical de MEDEA.
- **KCl** : Chlorure de potassium fourni par Riedel de Haen, de masse molaire 74.551 g/mol, et de pureté égale à 99.5%, soluble dans l'eau.
- **NaCl** : Chlorure de sodium fourni par Sigma Aldrich, de masse molaire 58.443 g/l et de pureté égale à 99%.

- **$NaPO_3$:** phosphate de sodium fourni par Riedel de Haen, de masse moléculaire 101.96 g/l, et de pureté égale à 99%.
- **$CaCl_2$:** chlorure de calcium fourni par Sigma Aldrich, de masse moléculaire 147.02 g/l, et de pureté égale à 99%.
- **HCl** : chlorure d'hydrogène fourni par SharLab, de masse molaire 36.4694 g/mol et de pureté égale à 99.5%.
- **NaOH** : hydroxyde de sodium fourni par Riedel de Haen, de masse molaire 39.997 g/l et d'une pureté de 99.5%.
- **Dodécylsulfate de sodium** (**SDS) :** un tensioactif ionique commercial fourni par Sigma Aldrich et à une pureté de 99%.
- **Cetyltrimethylammonium bromide** (**CTAB) :** un tensioactif cationique commercial fourni par Sigma Aldrich et à une pureté de 99%.
- **Tween 80** : c'est un liquide jaune soluble dans l'eau, de masse moléculaire 203,76 g/mol, fourni par Sigma Aldrich d'unr pureté de 99%.
- **Acétonitrile :** de formule chimique CH_3CN, c'est un liquide à 99.9% de pureté Grade UV-IR-HPLC-ISOCRATIC, fourni par Panreac.
- **Méthanol :** de formule chimique CH_3OH, c'est un liquide pur, Grade HPLC, fourni par Fluka.
- **Dihydrogénophosphate de potassium :** de formule chimique KH_2PO_4, c'est un liquide ayant un degré de pureté de 99-100%, fourni par Riedel-deHaën.
- **Eau distillée** ayant un pH de 6.76 et une conductivité de 8.22 µs, obtenue par un distillateur de type GFL.

III.2.2. Matériels

Le matériel utilisé durant cette étude est listé ci dessous :

- **Un agitateur** : de type OVAN model MCG15.
- **Une balance analytique** : de type Kern ALS 220-4N ayant une précision de 0.0001g.
- **Un bain ultrason** : de type Fisher Scientific (FB 15052).
- **Un pH mètre :** de type HACH d'une précision de 0.1 pH.
- **Un spectromètre UV-Visible** de type UV mini-1240 fourni par Shimdzu mesurant entre 190 et 1100 nm composé de :

- **Une source lumineuse :** une lampe de deutérium qui émet des radiations continues entre 180 – 380 nm.

- **Des Fentes :** ont pour rôle de diriger un faisceau de rayons lumineux parallèles vers la cellule contenant l'échantillon.
- **Un sélecteur de longueur d'onde :** un réseau qui est une plaque de verre munie de stries parallèles, ayant la propriété de disperser la lumière en ses diverses composantes.
- **Une cuvette :** de forme rectangulaire et de largeur de 1 cm contenant les échantillons en solution.

- **Un chromatographe en phase liquide (CLHP) de type Shimadzu LC-10A** composé de :
  - **un détecteur :** modèle SPD-10AVvp muni d'une lampe Deutérium ayant un spectre d'absorption allant de 190 à 350 nm.
  - **une pompe :** C'est l'unité dissolvante de la livraison de la HPLC, elle est de type LC-10 ADVP, Ce type de pompe maintient et protège facilement les échantillons à analyser contre l'interaction et la contamination.
  - **un dégazeur** : de modèle DGU-12A, c'est un dégazeur en ligne qui utilise une membrane de fluoro-éthylène.
  - **une colonne :** de type VP-ODS (125 x 4.6 mm), elle comporte la phase stationnaire qui s'agit de la phase inverse C_{18} constituée de molécules hydrophobes greffées sur du gel de silice.
  - **le four de la colonne** : de type CTO-10 Avp.
  - **une boucle d'injection** : Le volume maximum qu'on peut injecter dans cette vanne est de 20 µl et pour cela on utilise une seringue bien adaptée.
  - **des flacons** : Ce sont deux flacons en verre, le premier contient le solvant dans lequel plonge deux filtres reliés aux pompes par des tuyaux et le deuxième sert à recueillir le solvant après purgation.
  - **un intégrateur :** c'est le contrôleur du système utilisé au niveau de laboratoire désigné sous le nom de SCL-10Vvp, il commande directement tous les composants de série VP, son menu d'affichage est simplifié et facile à utiliser. Une interface facultative permet au système multiple du HPLC d'être relié à un ordinateur muni d'un logiciel puissant de chromatographie.
  - **un logiciel** : Le logiciel CLASS-VP est conçu pour piloter les systèmes HPLC Shimadzu de type (LC-10A). Il est connecté au contrôleur qui contrôle tous les modules de l'appareil et transmet le chromatogramme au logiciel permettant une meilleure manipulation et analyse du graphe.

III.3. Procédure expérimentale

III.3.1. Détermination de la CMC du biosurfactant

La concentration micellaire critique (CMC) est la concentration à partir de laquelle les molécules amphiphiles passent de l'état libre à l'état micellaire. A la CMC, de nombreuses propriétés physico-chimiques subissent une brusque discontinuité. La CMC est ainsi déterminée par une rupture de pente sur une courbe représentant la variation d'une propriété en fonction de la concentration en tensioactif.

Une méthode conductimétrique a été adoptée pour la détermination de la CMC du biosurfactant. Elle consiste à suivre la conductivité en fonction de la concentration du biosurfactant. Pour ce faire, on prépare une solution mère de concentration de 0.005 M, ensuite, on prépare, par dilution, des solutions filles dans des fioles de 50 ml qu'on va mesurer leurs conductivités.

III.3.2. Caractérisation des antibiotiques par UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible est basée sur la mesure de l'intensité d'absorption ou d'émission d'un rayonnement électromagnétique par les espèces à doser mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200 nm–400 nm), du visible, et jusqu'au proche infrarouge (750 nm-1400 nm).

Le principe est qu'un échantillon de la solution d'antibiotique à examiner est exposé à un rayon de lumière à une longueur d'onde bien déterminée, qui est absorbé, Lorsqu'un faisceau de rayonnement monochromatique incident d'intensité I_0 traverse une substance colorée, une absorption d'énergie a lieu de sorte que l'intensité du faisceau incident émergent I est plus faible. Cette absorption monochromatique suit la loi de Beer Lambert qui s'exprime :

$$A = \log I_0/I = \varepsilon C l$$

Avec:

A : absorbance, I : intensité du faisceau émergent (A), I_0 : intensité du faisceau incident (A), ε : coefficient spécifique d'absorption massique dépendant du composé et de la longueur d'onde considérée ($l.cm^{-1}.g^{-1}$), C : concentration massique du composé dosé (g/l) et l : largeure de la cellule (cm).



Figure III.1 : Spectrophotomètre UV-visible utilisé.

III.3.2.1. Elaboration des spectres électroniques

L'amoxicilline sodique et l'ampicilline sodique sont deux antibiotiques facilement solubles dans l'eau. Pour chacun d'eux, une solution de 200 mg/l a été préparée en dissolvant 20 mg de poudre d'antibiotique dans 100 ml d'eau distillée à un pH de 6.76 et une conductivité de 8.33µs.

Les solutions préparées étant incolores, leurs absorbances ont été déterminées dans un intervalle de longueur d'onde allant de 190 à 300 nm. Le maximum d'absorption est obtenue pour une valeur de longueur d'onde λ_{max} = 264 nm pour l'ampicilline, et une valeur de λ_{max} = 272 nm pour l'amoxicilline.

III.3.2.2. Elaboration des courbes d'étalonnage

La détermination de la concentration des deux antibiotiques en fonction du temps, nécessite l'élaboration d'une courbe d'étalonnage [DO = f(C)].

Dix dilutions ont été préparées à partir de la solution mère de 200 mg/l pour obtenir des solutions de concentrations connues, l'absorbance correspondante à chaque concentration a été mesurée pour chacune d'elles par le biais d'un spectrophotomètre UV-visible**,** en fixant la longueur d'onde au maximum d'absorption déjà obtenue.

III.3.3. Elimination des antibiotiques

III.3.3.1. Utilisation des tensioactifs classiques

Pour chacun des deux antibiotiques étudiés (amoxicilline et ampicilline), une solution d'antibiotique de 0.04 g/l a été préparée par dissolution de 0.004g de poudre d'antibiotique dans 100 ml d'eau distillée. Une quantité de tensioactif correspondante à la concentration utilisée est ajouté à la solution. L'absorbance de la solution initiale ($DO_{initiale}$ correspondant à $C_{initiale}$) a été mesurée par le spectrophotomètre UV-visible, le mélange a été mis sous agitation à une vitesse de 400 trs/min. une suivie cinétique a été effectuée en analysant des échantillons de la phase résiduelle par mesure de son absorbance chaque 5 min.

La même expérience a été effectuée par trois différents tensioactifs chimiques :

- Un tensioactif anionique : Dodécylsulfate de sodium (SDS).
- Un tensioactif cationique : Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB).
- Un tensioactif non-ionique : Tween 80.

L'efficacité du traitement appliqué a été évaluée en suivant la concentration résiduelle (C) qui peut être déterminée en exploitant les courbes d'étalonnage déjà obtenues. De plus, le rendement d'élimination d'antibiotique est calculé par la formule :

$$R = \frac{C_0 - C}{C_0} * 100$$

III.3.3.2. Utilisation du biosurfactant

III.3.3.2.1. Etude par UV-Visible

Une solution d'antibiotique de 0.04 g/l a été préparée par dissolution de 0.004g d'amoxicilline dans 100 ml d'eau distillée. Une quantité de biosurfactant correspondante à la concentration utilisée (C=0.024 g/l) est ajouté à la solution. L'absorbance de la solution initiale ($DO_{initiale}$ correspondant à $C_{initiale}$) a été mesurée par le spectrophotomètre UV, le mélange a été mis sous agitation à une vitesse de 400 trs/min. un suivi cinétique a été effectuée en analysant des échantillons de la phase résiduelle par mesure de son absorbance chaque 5 min.

Le même protocole opératoire a été appliqué en substituant l'amoxicilline par l'ampicilline.

III.3.3.2.2. Etude par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Afin de s'approcher aux milieux aquatiques réels, l'étude a été accomplie par des tests sur un milieu complexe contenant les deux antibiotiques simultanément. Pour ce faire, la méthode retenue pour l'analyse des échantillons était l'HPLC. Cette méthode qui permet la séparation des molécules au sein d'un mélange complexe, repose sur un phénomène de rétention dépendant d'une phase mobile et d'une phase stationnaire.

Les composés à séparer (amoxicilline et ampicilline) sont mis en solution dans un solvant (l'eau distillée). Ce mélange est injecté par l'intermédiaire d'une vanne, puis transporté au travers du système chromatographique (Figure III.2) par la phase mobile liquide (éluant).

Au niveau de la colonne, les composés en solution se répartissent suivant leur affinité, entre la phase mobile et la phase stationnaire. La théorie de la séparation montre que le signal enregistré à la sortie d'un détecteur approprié, en fin de colonne a la forme d'un pic. Si la séparation est bonne, chaque pic représente un constituant du mélange à séparer. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme**.**



Figure III.2 : Chromatographe utilisé durant les analyses HPLC.

- **Préparation des échantillons**

La méthode retenue pour l'étude de l'élimination des antibiotiques au moyen du biosurfactant comporte les étapes suivantes :

- deux solutions mères ont été préparées en mélangeant 60 mg du standard pur (l'amoxicilline trihydratée) ainsi que pour le standard pur (l'ampicilline trihydratée) dans un litre d'eau distillée afin d'obtenir une solution mère d'une concentration de 0.06 mg/ml de standard, Par la suite deux solutions mères de concentration 0.04 mg/ml de chaque antibiotique (témoin) ont été préparés afin de quantifier le titre par rapport au standard.
- Un volume de 10 ml de la solution d'antibiotiques est mis en contact avec une quantité de biosurfactant correspondant à une concentration bien déterminée dans un bécher de 100 ml. Le mélange est mis dans un bain ultrason pour assurer la dissolution du biosurfactant.
- Le milieu est soumis sous agitation à une vitesse de 400 trs/min. Des prélèvements de la solution résiduelle sont pris au moyen d'une seringue à des intervalles de temps de 5 min. Ces échantillons sont filtrés sur un filtre à seringue, les filtrats sont transférés dans des flacons HPLC en verre (vials) pour être analysé.

- **Préparation de la phase mobile**

La phase mobile a été préparée en mélangeant : 10 ml d'acétonitrile est ajouté au 90 ml de la solution tampon préparée par la dissolution de 13.6 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée aqueux, ce tampon est une solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium 0.1 M, dont le rôle est d'éviter que les pics présentent des trainées importantes ; L'ajustement du pH a été effectué par utilisation de solution aqueuse de KOH (45%) sous agitation jusqu'à avoir un pH égal à 5. Il est impératif de passer la phase mobile dans le dispositif de filtration en utilisant des filtres de 0.45 µm puis dans le bain à ultrason afin d'éviter les pics parasites de l'eau distillée.

- **Conditions d'analyse HPLC**

L'utilisation des conditions d'analyse HPLC optimales permet d'avoir des chromatogrammes de bonne qualité tout en minimisant le temps de rétention des antibiotiques analysés. Pour cela, on a appliqué les conditions suivantes :

- Composition de la phase mobile : acétonitrile/Tampon aqueux à un rapport volumique de 10/90.
- Débit de la phase mobile : 1.5 ml/mn.
- pH de la phase mobile : 5.3
- longueur d'onde du détecteur UV : 230 nm.
- Type d'analyse : mode isocratique.

- **Exploitation des chromatogrammes / calcul du titre en HPLC**

L'exploitation des chromatogrammes de l'échantillon initial de concentration connue **(C_0)** et celui résiduel de concentration à déterminer **(C_e)** permet de quantifier le pourcentage des antibiotiques capté par le tensioactif **(*R*)** ainsi que la concentration résiduelle **(C_e).**

L'évaluation de ces paramètres se fait en déterminant le titre de la solution initiale et celle à l'équilibre par rapport à une référence désignée par *standard.* Il s'agit de l'amoxicilline trihydratée pour la quantification de l'amoxicilline et de l'ampicilline trihydratée pour la quantification de l'ampicilline.

La procédure de calcul utilisée est la suivante :

– Détermination du titre de la solution initiale (T_0) :

$$T_0 = \frac{A_0}{A_{std}} \times \frac{C_{std}}{C_0} \times p$$

– Détermination du titre de la solution à l'équilibre (T_e) :

$$T_e = \frac{A_e}{A_{std}} \times \frac{C_{std}}{C_0} \times p$$

– Détermination du pourcentage d'antibiotique éliminé :

$$R = T_0 - T_e$$

– Détermination de la concentration résiduelle (C_e) :

$$C_e = C_0 - \frac{C_0\, R}{100}$$

Où

T_0 : Titre de la solution initiale en %.

T_e : Titre de la solution à l'équilibre en %.

C_{std} : concentration du standard en mg/ml.

C_0 : concentration de la solution initiale en mg/ml.

A_0 : l'aire du pic correspondant à la solution initiale.

A_e : l'aire du pic correspondant à la solution à l'équilibre.

A_{std} : l'air du pic correspondant au standard.

p : pureté du standard en %.

Les aires des deux standards (Amoxicilline trihydratée et Amplicilline trihydratée) désignées par A_{std} ont été déterminées en injectant une solution de chacun d'eux à une concentration bien déterminée C_{std}.

III.4. Présentation des résultats

III.4.1. Détermination de la CMC

Les résultats sont rapportés sur les tableaux ci-dessous (Tableau III.1).

Tableau III.1. Conductivité en fonction de la concentration du biosurfactant

C (mg/L)	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40
K ($\mu S/cm$)	105	112	121	128	137	140	144	148	151	156	160

La figure III.3 illustre la variation de la conductivité en fonction de la concentration du biosurfactant en solution, ceci permet de déterminer la concentration micellaire critique du biosurfactant. La valeur de la CMC correspond au point de rupture des deux droites. Elle est estimeé à 24 mg/l.

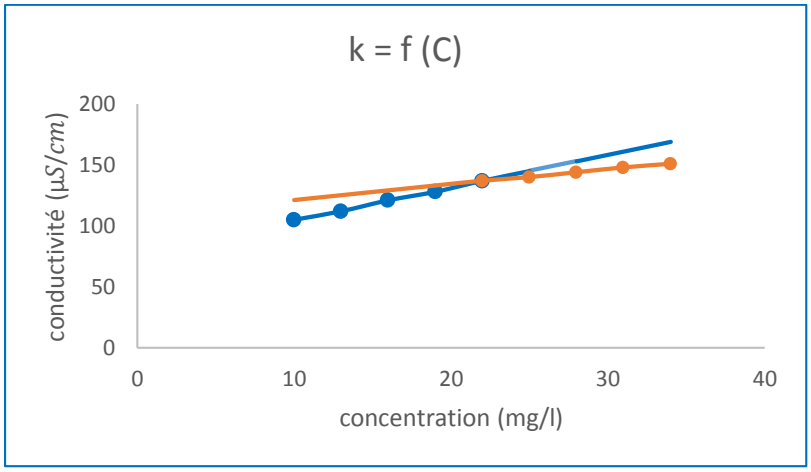


Figure III.3. Variation de la conductivité en fonction de la concentration du biosurfactant

A la lumière des résultats trouvés, nous remarquons que la conductivité augmente avec la concentration du biosurfactant jusqu'à une certaine concentration à partir de laquelle on observe un changement de pente. Cela est dû au fait que les premiers agrégats micellaires commencent à se former spontanément à partir d'une certaine concentration : la concentration micellaire critique (CMC). En effet, lorsque l'on se trouve en dessous de la valeur de la CMC, les molécules monomériques du tensioactif influencent directement la conductivité alors que cette dernière augmente d'une manière moins importante au-delà de la CMC. Le biosurfactant se comporte comme un électrolyte classique. Au-dessus de la CMC, la conductivité croît plus lentement. Les micelles sont des transporteurs de charge moins efficaces que le même nombre de monomères totalement dissociés, ce qui explique la diminution de la pente. Le point d'intersection des deux droites correspond à la CMC du biosurfactant qui est de 24 mg/l

III.4.2. Caractérisation des antibiotiques par UV-Visible

- **Elaboration des courbes d'étalonnage**

Les valeurs de la densité optique sont raportées dans le tableau III.2 ci-dessous.

Tableau III.2. Absorbances de l'amoxicilline à λ= 272 et de l'ampicilline à λ= 264

C (mg/l)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
DO_{Amx}	0.054	0.176	0.208	0.282	0.416	0.543	0.591	0.703	0.825	0.891
DO_{Amp}	0.46	0.96	1.41	1.86	2.33	2.9	3.2	3.6	4.1	5.2

Les valeurs obtenues ont permis de tracer la courbe d'étalonnage DO = f (C) pour chaque antibiotique en utilisant le logiciel Excel 2013 (Figure III.4 et III.5).

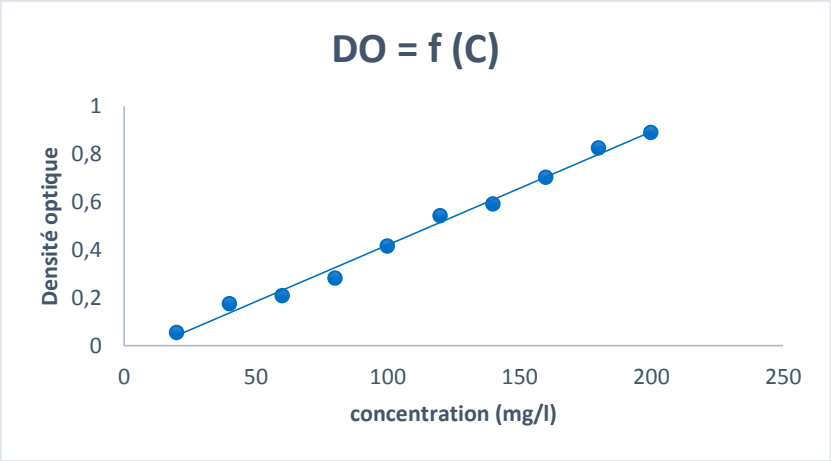


Figure III.4 : Courbe d'étalonnage de l'amoxicilline

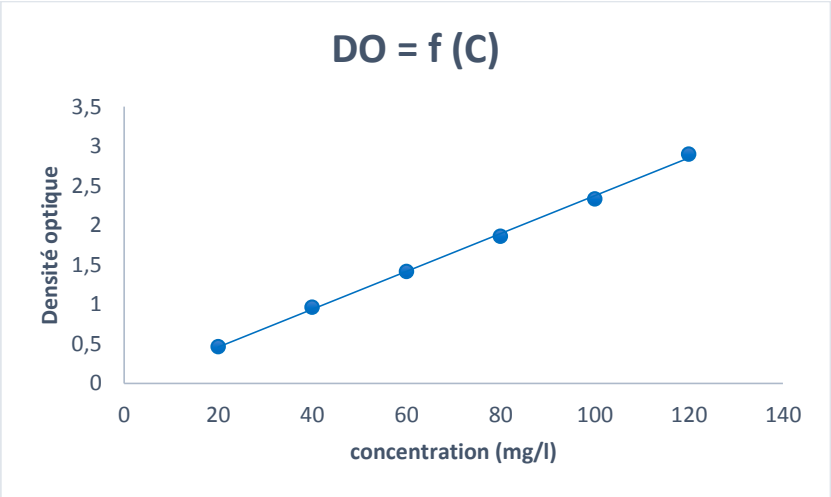


Figure III.5 : Courbe d'étalonnage de l'ampicilline

Pour les deux courbes d'étalonnage obtenues, on remarque que la loi de Beer-Lambert est vérifiée. De plus, la régression linéaire de ces résultats est une droite d'équation :

$$DO = \varepsilon\ C$$

Les résultats sont regroupés dans le tableau III.3

Tableau III.3 : Résultats de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage

Antibiotique	**Coefficient d'absorption (ε)**	**Coefficient de corrélation (R^2)**
Amoxicilline	0.0047	0.992
Ampicilline	0.0023	0.9985

III.4.3. Elimination des antibiotiques au moyen de tensioactifs classiques

III.4.3.1. Utilisation du tensioactif cationique (CTAB)

Le tableau III.4 regroupe les valeurs des concentrations résiduelles et des pourcentages de rétention pour une quantité de CTAB de 0.03 g correspondante à sa CMC. Ces données sont représentées sur la figure III.6

Tableau III.4. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par CTAB

t (min)	Amoxicilline		Ampicilline	
	C_r (mg/l)	R (%)	C_r (mg/l)	R (mg/l)
0	40	0	40	0
5	38.09	4.76	35.63	10.91
10	33.01	17.46	34.25	14.36
15	31.11	22.22	26.66	33.33
20	23.49	41.26	21.14	47.12
25	19.68	50.09	20.22	49.42
30	19.57	50.79	20.01	49.53
35	24.76	34.92	14.48	63.79

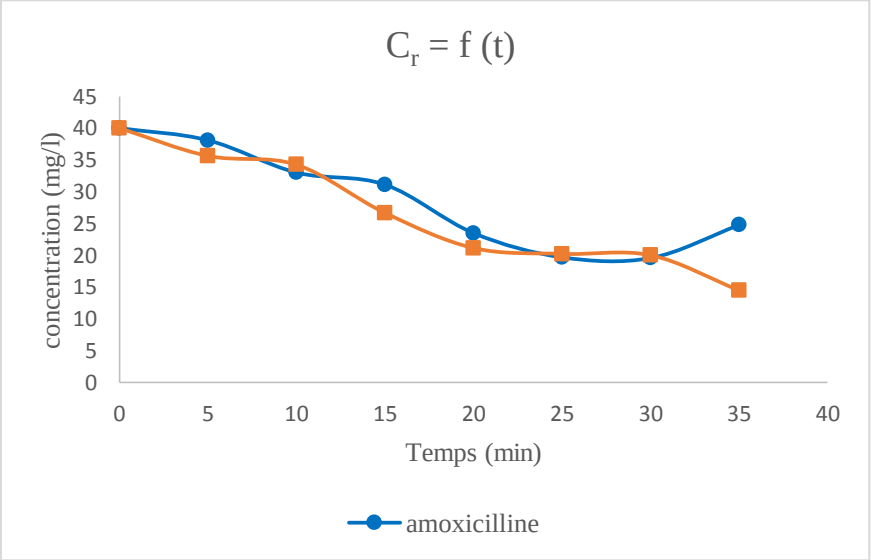


Figure III.6 : Concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminés par CTAB

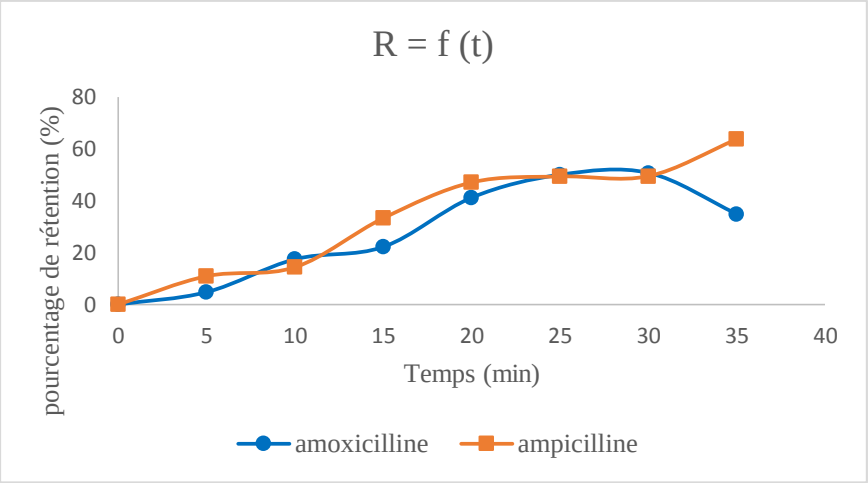


Figure III.7 : Pourcentages de rétentions d'antibiotiques par CTAB

La figure III.7 montre la cinétique d'adsorption de chacun des antibiotiques par le tensioactif cationique utilisé pour le traitement. La superposition des deux courbes indique que l'amoxicilline et l'ampicilline se comportent de la même manière en présence du CTAB avec un temps de contact optimal de 30 min, et un taux de rétention d'environ 50%.

III.4.3.2. Utilisation du tensioactif non ionique (Tween 80)

Le tableau III.5 regroupe les valeurs des concentrations résiduelles et des pourcentages de rétention pour une quantité de tensioactifs de 0.013 g correspondante à la CMC. Ces données sont représentées sur la figure III.8

Tableau III.5. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par Tween 80

t (min)	Amoxicilline		Ampicilline	
	C_r (mg/l)	R (%)	C_r (mg/l)	R%
0	40.00	00.00	40.00	00.00
5	37.24	6.89	22.50	43.75
10	33.10	173.24	15.83	60.41
15	31.72	20.68	13.33	66.66
20	22.75	43.10	10.00	75.00
25	20.68	48.27	6.66	83.33
30	20.59	49.02	6.70	83.25
35	26.2	34.48	17.5	50.00

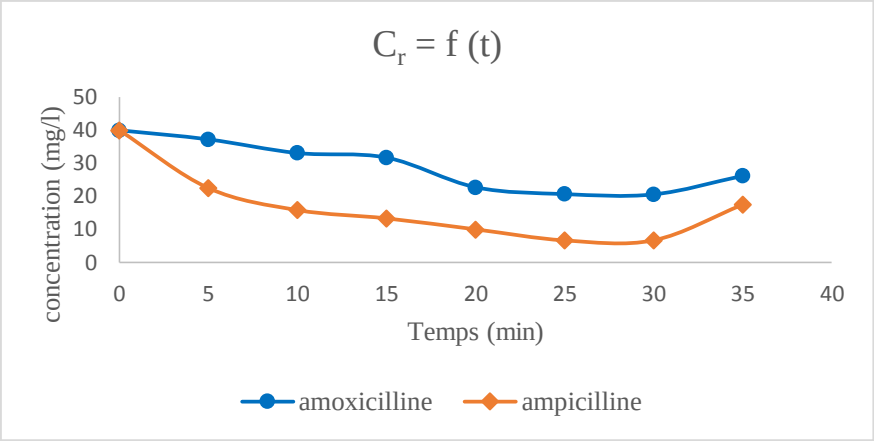


Figure III.8 : Concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par Tween 80

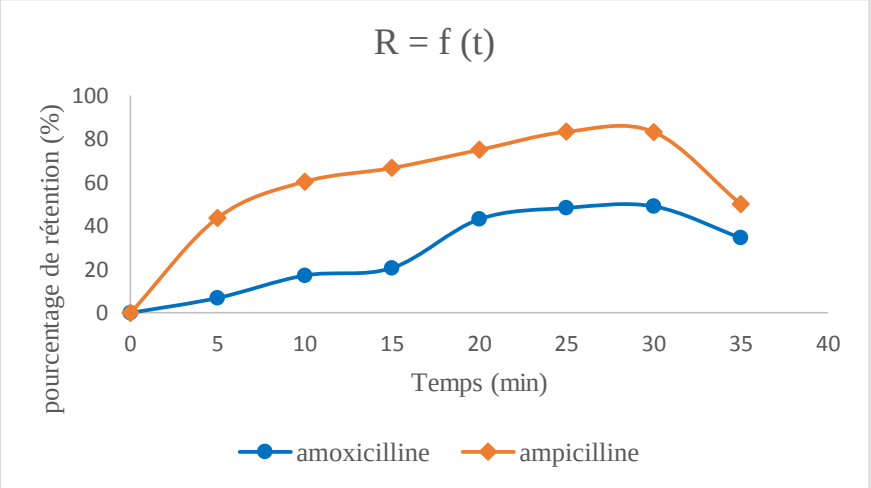


Figure III.9 : Pourcentages de rétentions d'antibiotiques par Tween 80

L'étude de la cinétique d'adsorption de l'amoxicilline et de l'ampicilline par du Tween 80 en milieu aqueux, montre que l'équilibre est atteint au bout de 25 minutes pour les deux effluents (Figure III.8). Cependant, la comparaison des taux de rétention obtenus (Figure III.9) montre que ce tensioactif non-ionique présente une capacité d'adsorption plus importante vis-à-vis de l'ampicilline que l'amoxicilline. En effet, le traitement permet d'éliminer 83% d'ampicilline devant 49% d'amoxicilline.

III.4.3.3. Utilisation du tensioactif anionique (SDS)

Le tableau III.6 regroupe les valeurs des concentrations résiduelles et des pourcentages de rétention pour une quantité de tensioactifs de 0.3 g correspondante à la CMC. Ces données sont représentées sur la figure III.10

Tableau III.6. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par SDS

t (min)	Amoxicilline		Ampicilline	
	C_r (mg/l)	R (%)	C_r (mg/l)	R%
0	40.00	00.00	40	00.00
5	34.14	14.63	35.00	2.50
10	23.41	41.46	30.00	25.00
15	21.46	46.34	28.33	29.16
20	15.60	60.97	23.33	41.66
25	15.67	60.82	22.96	42.6
30	24.26	39.35	35.00	12.5

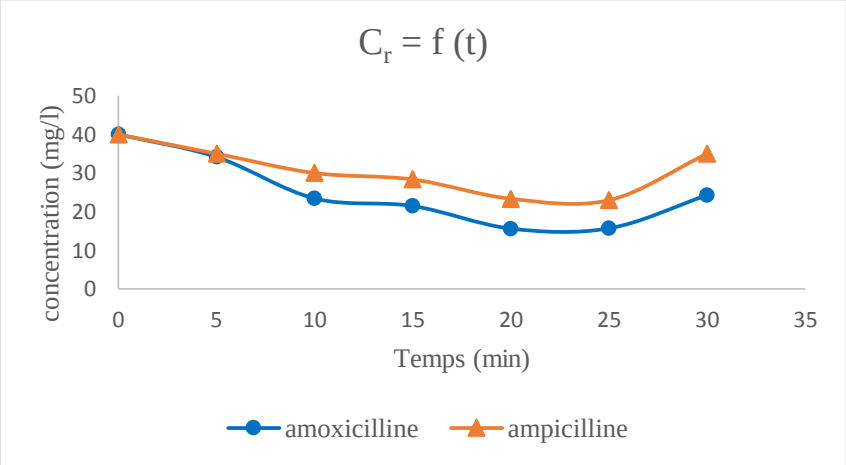


Figure III.10 : Concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par SDS

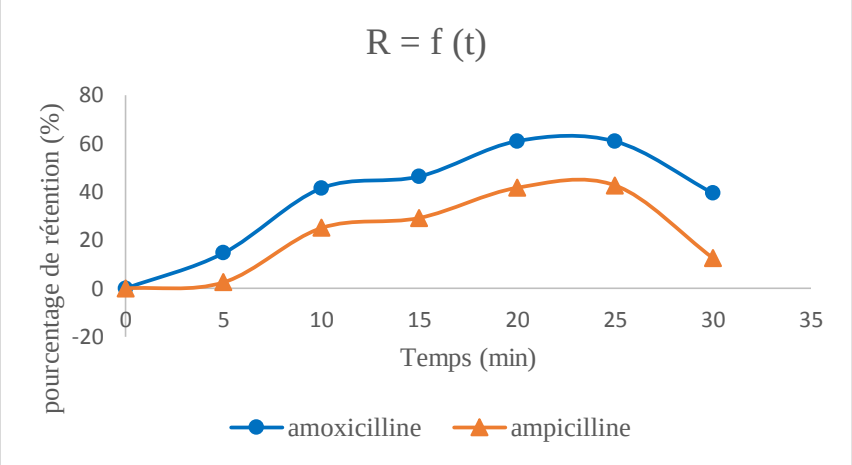


Figure III.11 : Pourcentages de rétentions d'antibiotiques par SDS

La variation de la concentration résiduelle en fonction du temps (Figure III.10) montre que l'équilibre d'adsorption entre chacun des deux antibiotiques et le tensioactif anionique utilisé est atteint au bout d'un temps de contact de vingt-cinq minutes. Cependant, la figure III.11 montre que le pourcentage d'élimination de l'amoxicilline atteint presque 61%, une valeur bien meilleure que celle obtenu avec l'ampicilline qui est de 42.6%.

III.4.4. Utilisation du biosurfactant pour le traitement des milieux simples

Cette partie est consacrée à l'étude de la capacité du traitement au moyen du biosurfactant, adsorbant naturel, non toxique afin d'éliminer les deux antibiotiques à savoir l'amoxicilline et l'ampicilline présents à part dans un milieu aqueux.

III.4.4.1.Etude de l'établissement de l'équilibre

Les résultats du suivi cinétique sont rapportés dans le tableau III.7

Tableau III.7. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant

T (min)	Amoxicilline		Ampicilline	
	C_r (mg/l)	R (%)	C_r (mg/l)	R (%)
0	40	0	40	0
5	38.43	3.92	32.22	19.44
10	33.72	15.69	14.36	64.1
15	20.39	49.02	13.84	65.38
20	18.82	52.94	12.3	69.23
25	17.25	56.86	12.23	69.41
30	17.64	55.9	17.95	55.12

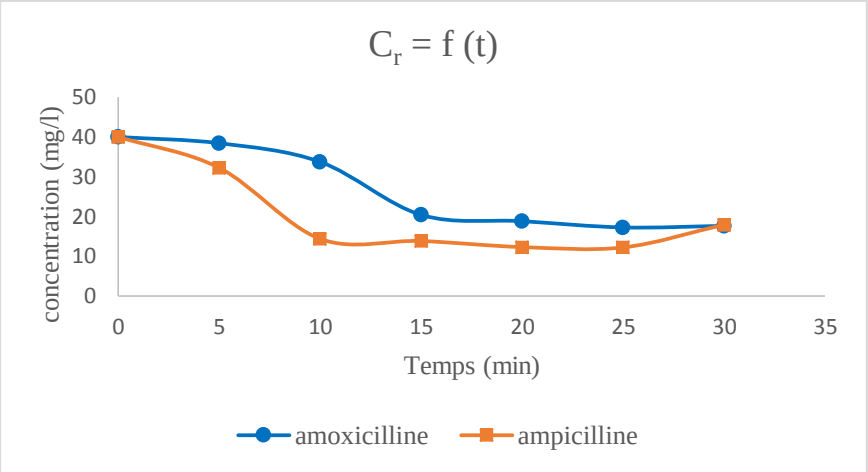


Figure III.12 : Concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant

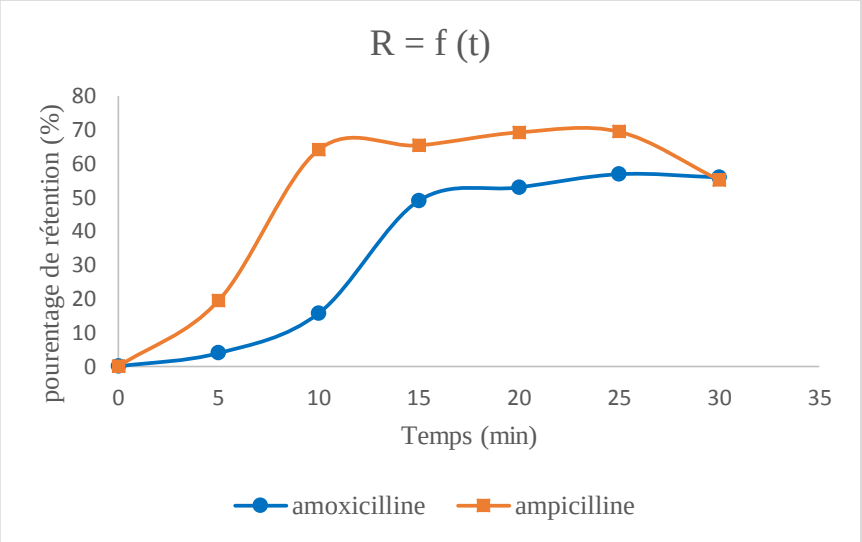


Figure III.13 : Pourcentages de rétention des antibiotiques par le biosurfactant

La figure III.12 montre l'évolution de la concentration en amoxicilline et en ampicilline au cours du temps en appliquant le même traitement au moyen du biosurfactant.

A la lumière des résultats, on observe une diminution rapide de la concentration de chaque antibiotique, notamment dans le cas de l'ampicilline, suivie d'une diminution progressive jusqu'à atteindre un palier d'équilibre. On constate aussi que la concentration en amoxicilline a diminué de 40 mg/L jusqu'à 17.25 mg/L, alors que celle de l'ampicilline a passée de 40 mg/L à 12.23 mg/L au bout d'un temps de contact optimal de 25min. Ceci est dû à l'adsorption de l'antibiotique par le biosurfactant. L'augmentation de la concentration en antibiotique dans le milieu au-delà du temps de contact de 25 min peut être expliquée à un phénomène de désorption des molécules d'antibiotiques captées par le biosurfactant.

A l'instar de la Figure III.13, on constate que le biosurfactant présente une capacité d'adsorption plus importante vis-à-vis de l'ampicilline que de l'amoxicilline. En effet, le traitement permet d'éliminer 69.41% d'ampicilline et 56.86% d'amoxicilline.

III.4.4.2. Etude de l'influence de quelques paramètres sur l'élimination de l'amoxicilline et de l'ampicilline par le biosurfactant

L'optimisation des paramètres influençant l'adsorption d'antibiotique est une étape essentielle dans le procédé d'adsorption. Elle permet d'une part d'étudier sa cinétique de sorption et d'autre part, déterminer la quantité maximale adsorbée par le biosurfactant dans les conditions opératoires choisies.

III.4.4.2.1 Effet de l'agitation

La vitesse d'agitation est considérée comme un facteur important dans le procédé d'adsorption. Afin de déterminer la vitesse d'agitation optimale, l'étude a été effectuée avec différentes vitesses d'agitation 200, 400 et 500 trs/min.

- **Cas de l'amoxicilline**

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux (III.8 et III.9) et illustrés sur les figures (III.14 et III.15)

Tableau III.8 : Concentrations résiduelles de l'amoxicilline à différentes vitesses d'agitation

t (min)	C_r (mg/l)		
	200 trs/min	**400 trs/min**	**500 trs/min**
0	40	40	40
5	36.36	38.43	38.95
10	29.9	33.72	37.89
15	21.82	20.39	36.31
20	22.41	18.82	36.99
2	24.1	17.25	38.42
30	26.26	17.64	38.59

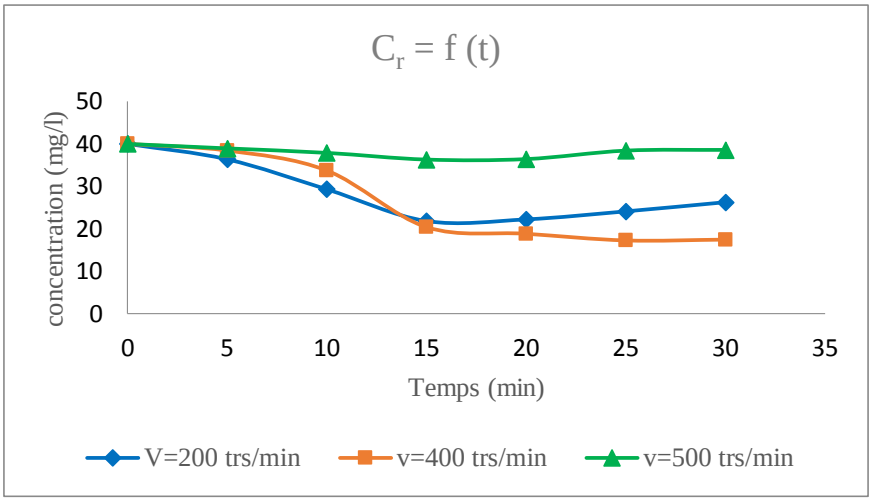


Figure III.14 : Effet d'agitation sur la concentration résiduelle de l'amoxicilline

Tableau III.9 : Pourcentages de rétention de l'amoxicilline à différentes vitesses d'agitation

T (min)	R (%)		
	200 trs/min	400 trs/min	500 trs/min
0	0	0	0
5	9.09	3.92	2.63
10	25.25	15.69	5.26
15	45.45	49.02	9.21
20	45.06	52.94	9.10
2	34.34	56.86	6.26
30	20.20	56.67	3.95

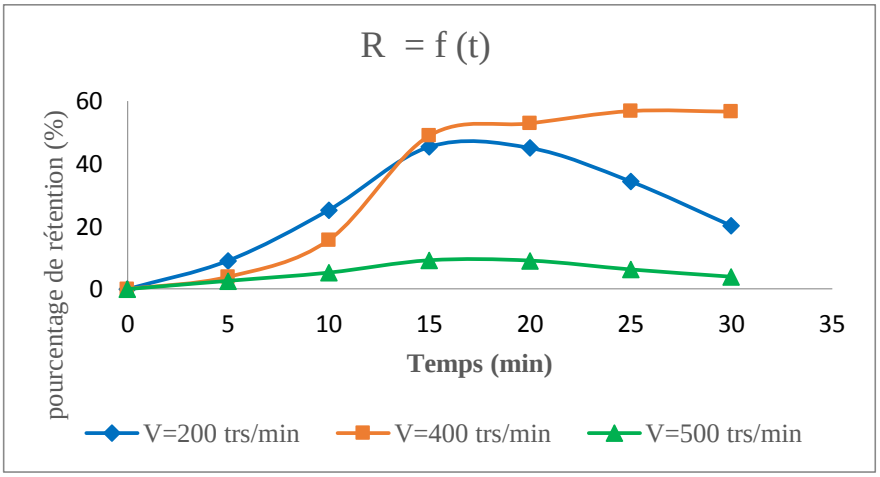


Figure III.15 : Effet d'agitation sur le pourcentage de rétention d'amoxicilline

L'optimisation de la vitesse d'agitation lors de l'élimination de l'amoxicilline contenue dans une solution aqueuse, consiste à déterminer expérimentalement celle qui permet l'adsorption d'une plus grande quantité d'effluent. Les résultats montrent que la concentration résiduelle d'amoxicilline dépend de la vitesse d'agitation de la solution (figure III.14). En effet, l'élimination de cet antibiotique par le biosurfactant est meilleure à 400 tr/min avec un rendement maximal de 56.86 % (Figure. III.15).

A 500 tr/min, la concentration résiduelle d'amoxicilline on remarque une légère diminution, et on note que le taux de rétention maximale ne dépasse pas 9.21% au bout du temps d'équilibre de 20min. Cela est dû probablement à un phénomène de désorption des molécules d'effluent captées par le biosurfactant favorisée par la grande vitesse d'agitation utilisée. Un taux de 45.45% a été obtenu pour une faible vitesse d'agitation (200 tr/min). Dans ce cas, la fixation d'amoxicilline est moins importante.

- **Cas de l'ampicilline**

Les tableaux (III.10 et III.11) et les figures (III.16 et III.17) illustrent les résultats concernant l'étude de l'effet de l'agitation sur le traitement, au moyen du biosurfactant, d'un milieu simple contenant l'effluente ampicilline.

Tableau III.10 : Concentrations résiduelles de l'ampicilline à différentes vitesses d'agitation

t (min)	**C_r (mg/l)**		
0	**200 trs/min**	**400 trs/min**	**500 trs/min**
5	40	40	40
10	36.44	32.22	35.83
15	34.67	14.36	34.02
20	28.22	13.84	32.41
25	21.33	12.3	32.41
30	22.98	12.23	32.41
35	25.13	14.95	34.29

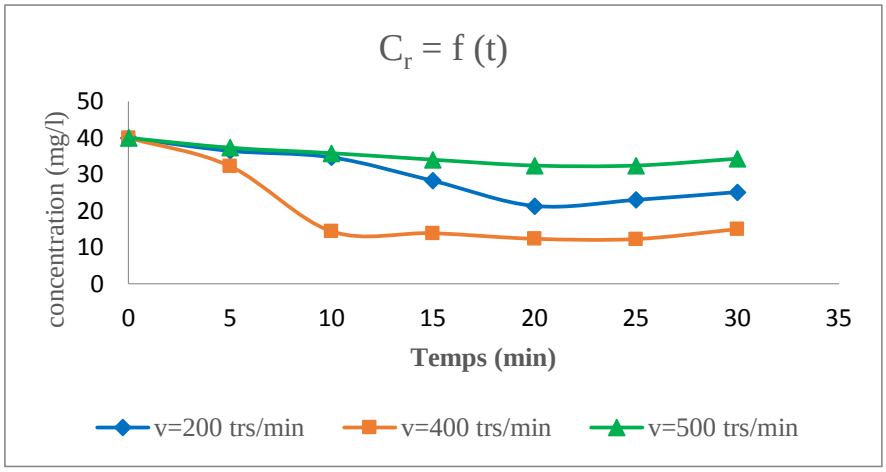


Figure III.16 : Effet d'agitation sur la concentration résiduelle de l'ampicilline

Tableau III.11 : Pourcentages de rétention de l'ampicilline à différentes vitesses d'agitation

t (min)	R (%)		
	200 trs/min	400 trs/min	500 trs/min
0	0	0	0
5	8.9	19.44	6.72
10	13.32	64.10	10.45
15	29.45	65.38	14.95
20	46.67	69.23	18.97
25	42.55	69.41	18.97
30	37.17	55.12	14.27

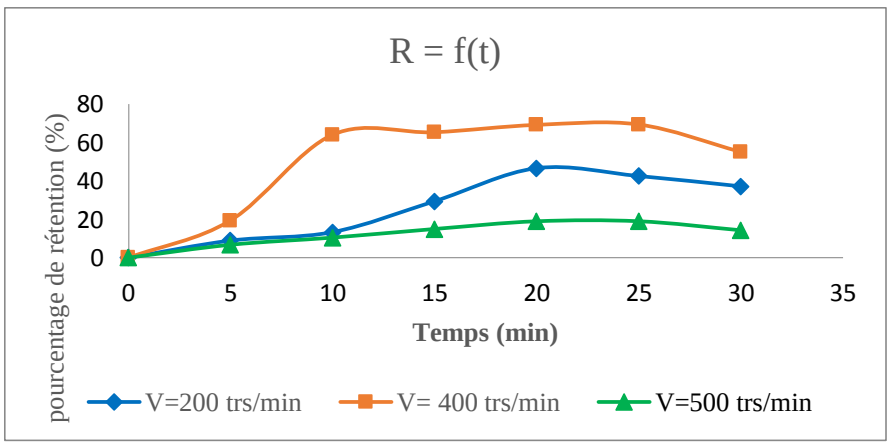


Figure III.17 : Effet d'agitation sur le pourcentage de rétention d'ampicilline

D'après la figure (III.16), on remarque que l'agitation influence l'adsorption de l'ampicilline par le biosurfactant d'une manière semblable à celle de l'amoxicilline. En effet, quand le mélange est agité à des vitesses de 200trs/min et 400trs/min, les particules d'effluents se déplacent rapidement avec la solution, augmentant ainsi leur concentration au voisinage des micelles du biosurfactant en facilitant leur adsorption. On note ainsi que le taux de rétention de l'ampicilline augmente de 46.67% à 69.41% lorsqu'on augmente la vitesse d'agitation de 200 à 400 trs/min (figure III.17). Cependant, une vitesse d'agitation très élevée (500trs/min) fournie une énergie additionnelle suffisante pour briser les liaisons éventuellement formées entre les molécules d'antibiotiques et l'adsorbant, ce qui aboutit à une faible valeur de rétention de l'effluent correspondant à un taux d'environ 19%.

- **Comparaison de l'effet de la vitesse d'agitation sur l'élimination des deux antibiotiques**

Les résultats obtenus précédemment ont permis de comparer le rendement maximal obtenu aux différentes vitesses d'agitation testés pour les deux effluents (figure III.18).

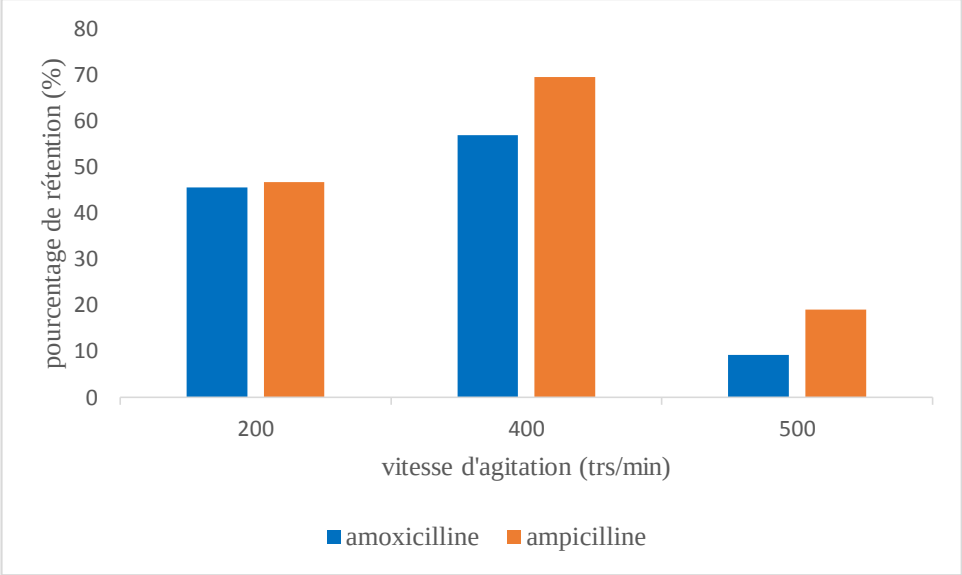


Figure III.18 : Rendement de l'adsorption des antibiotiques en fonction de la vitesse d'agitation

On constate que la rétention est mieux favorisée à la vitesse d'agitation modérée de 400 tr/min pour les deux antibiotiques. Pour cela, nous avons choisi de travailler à cette vitesse pour la suite de cette étude.

III.4.4.2.2. Effet de la concentration d'antibiotique

Pour étudier l'effet de la concentration initiale en antibiotique, des tests ont été effectués à différentes concentrations initiales allant de 0.01 à 0.06 g/l pour chaque effluent.

- **Cas de l'amoxicilline**

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux (III.12 et III.13) et illustrés sur les figures (III.19 et III.20)

Tableau III.12. Concentrations résiduelles à différentes concentrations initiales d'amoxicilline

t (min)	C_r (mg/l)				
	0.01 (g/l)	**0.02 (g/l)**	**0.03 (g/l)**	**0.04 (g/l)**	**0.06 (g/l)**
0	10	20	30	40	60
5	8.82	17.63	24.67	35.43	48.39
10	5.96	14.07	21.85	23.72	39.67
15	5.78	11.64	17.46	20.39	30.37
20	5.79	10.49	14.58	18.82	35.75
25	5.87	10.54	13.93	17.25	31.42
30	5.92	10.9	13.41	17.32	32.82

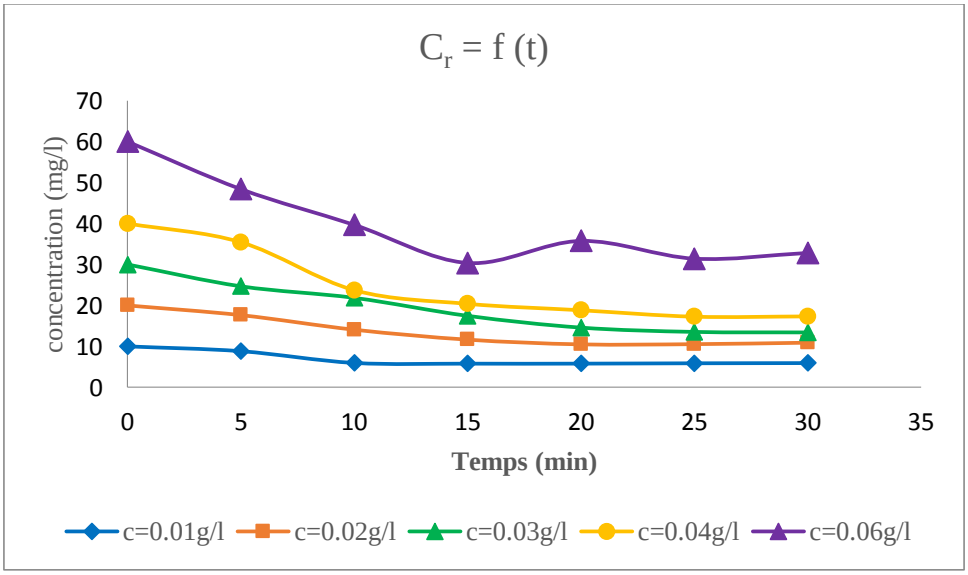


Figure III.19 : Effet de la concentration initiale d'amoxicilline sur sa concentration résiduelle

Tableau III.13. Pourcentages de rétention à différentes concentrations initiales d'amoxicilline

t (min)	R (%)				
	0.01 (g/l)	**0.02 (g/l)**	**0.03 (g/l)**	**0.04 (g/l)**	**0.06 (g/l)**
0	0	0	0	0	0
5	11.8	11.85	17.76	11.42	19.35
10	40.4	29.65	27.1	40.7	33.87
15	42.2	41.8	41.8	49.02	49.38
20	42.1	47.55	51.4	52.95	49.41
25	41.3	47.3	53.55	56.87	47.63
30	40.8	45.5	55.3	56.7	45.3

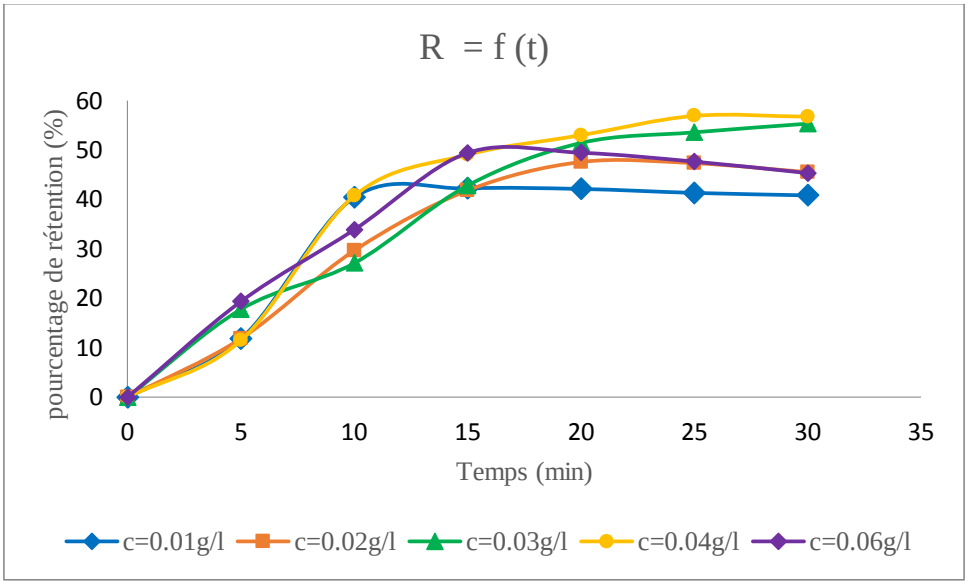


Figure III.20 : Effet de la concentration initiale d'amoxicilline sur le pourcentage de sa rétention

La figure III.19, montre que la capacité d'adsorption de l'amoxicilline augmente avec l'augmentation de la concentration initiale. Le rendement de rétention augmente pour des concentrations 0.01 et 0.04 g/l ensuite il subit une diminution à la concentration de 0.06 g/l comme le montre la figure III.20. Ceci peut être expliqué par le fait qu'à de faibles concentrations le rapport entre les micelles et les molécules d'effluent dans la solution est élevé, et donc toutes les particules peuvent être retenues par le biosurfactant et éliminées de la solution. Cependant, à la concentration la plus élevée de 0.06 g/l, on atteint la saturation des micelles du

biosurfactant par les molécules de l'effluent suivie du processus de désorption, et donc une quantité des molécules d'effluent reste libre dans la solution, donnant un rendement plus faible que celui obtenu avec une charge initiale en adsorbat de 0.04 g/L.

- **Cas de l'ampicilline**

Les résultats obtenus en étudiant le comportement du biosurfactant vis-à-vis de l'ampicilline lorsque sa concentration initiale prend différentes valeurs sont résumés dans les tableaux III.14 et III.15, et illustrés par les figures III.21 et III.22.

Tableau III.14 : Concentrations résiduelles à différentes concentrations initiales d'ampicilline

t (min)	C (mg/l)			
	0.01 g/l	**0.03 g/l**	**0.04 g/l**	**0.06 g/l**
0	10	30	40	60
5	8.8	24.53	32.22	52.8
10	6.60	18.12	14.36	39.6
15	60	14.90	13.84	36
20	5.98	14.8	12.3	35.92
25	6.8	15.86	12.23	40.08

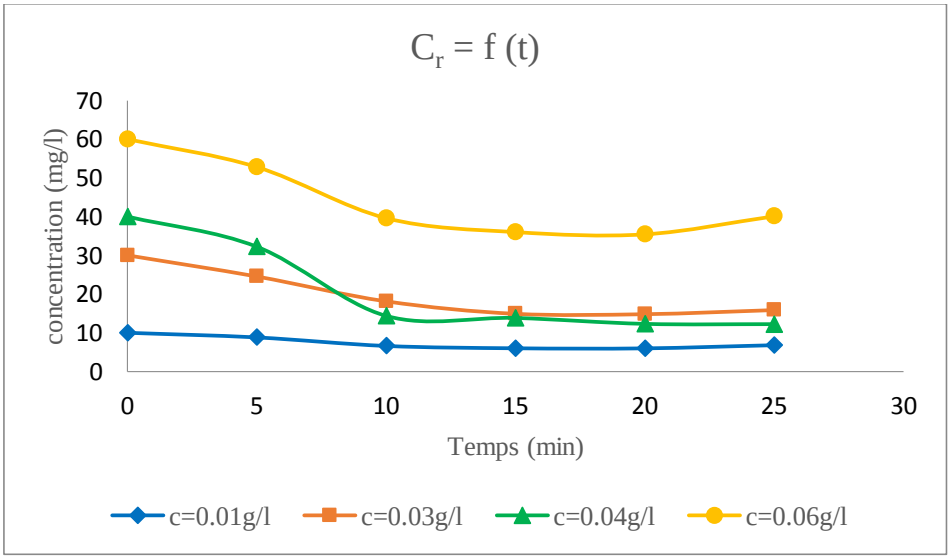


Figure III.21 : Effet de la concentration initiale d'ampicilline sur sa concentration résiduelle

Tableau III.15 : Pourcentage de rétention à différentes concentrations initiales d'ampicilline

t (min)	R (%)			
	0.01 g/l	**0.03 g/l**	**0.04 g/l**	**0.06 g/l**
0	0	0	0	0
5	16.81	18.22	19.44	12
10	41.97	39.57	64.1	34
15	41.97	50.32	65.38	40
20	29.62	50.64	69.23	40.12
25	13.58	47.13	69.41	33.2

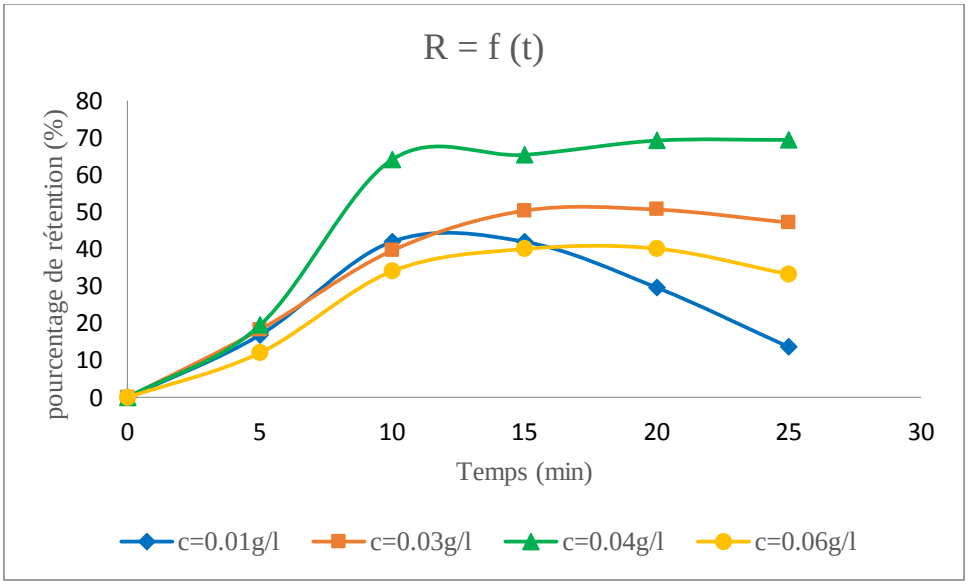


Figure III.22 : Effet de la concentration initiale d'ampicilline sur le pourcentage d'élimination

D'après la figure III.21, on observe, pour toutes les concentrations en effluents testés, une diminution de la concentration résiduelle de l'ampicilline en fonction du temps jusqu'à atteindre le palier d'équilibre. De plus, la figure III.22 montre que l'augmentation de la concentration initiale en antibiotique entre 0.01 et 0.04 g/l entraîne une augmentation de la capacité d'adsorption, alors que l'efficacité de rétention diminue pour la concentration de 0.06 mg/l. Ceci est dû probablement à la saturation des sites du biosurfactant qui n'aura plus la capacité d'adsorber plus de molécules d'effluent à cette concentration.

- **Comparaison de l'effet de la concentration initiale en effluent sur l'élimination des deux antibiotiques**

La comparaison entre le rendement maximal obtenu en variant la concentration initiale en effluent est schématisée ci-dessous (figure III.23).

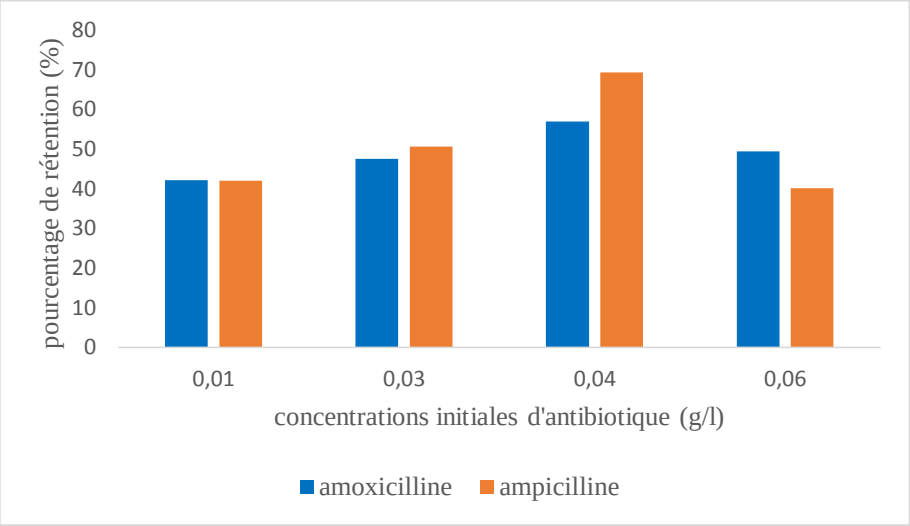


Figure III.23 : Rendement de l'adsorption des antibiotiques en fonction des concentrations initiales

On peut conclure que la capacité du biosurfactant à éliminer par adsorption l'amoxicilline et l'ampicilline augmente avec l'augmentation de la charge initiale en effluent jusqu'à une certaine valeur pour laquelle l'adsorbant atteint sa capacité maximale de rétention.

III.4.4.2.3. Effet de la concentration en biosurfactant

Afin d'optimiser la concentration en biosurfactant nécessaire pour l'élimination d'amoxicilline l'étude a été effectuée avec différentes quantités de biosurfactant allant de 0.0012, 0.0024 et 0.0048 g qui correspondent à ½ CMC, CMC et 2*CMC.

- **Cas de l'amoxicilline**

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux (III.16 et III.17) et illustrés sur les figures (III.24 et III.25)

Tableau III.16. Concentrations résiduelles de l'amoxicilline à différentes concentrations de biosurfactant

t (min)	C_r (mg/l)		
	0.012 g/l	**0.024 g/l**	**0.048 g/l**
0	40	40	40
5	39.13	38.43	36.36
10	37.41	33.72	35.84
15	36.26	20.39	32.72
20	28.2	18.82	32.88
25	28.37	17.25	35.44
30	33.99	17.32	37.96

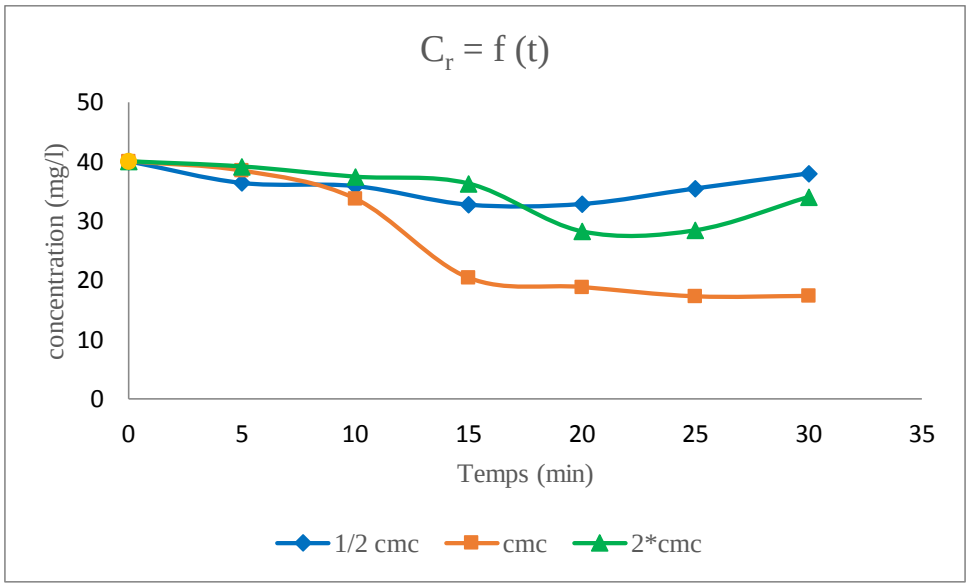


Figure III.24 : Effet de la concentration en biosurfactant sur l'élimination d'amoxicilline

Tableau III.17. Pourcentages de rétention de l'amoxicilline à différentes concentrations de biosurfactant

t (min)	R (%)		
	0.012 g/l	**0.024 g/l**	**0.048 g/l**
0	0	0	0
5	2.16	3.92	9.09
10	6.47	15.69	10.39
15	9.35	49.02	18.2
20	29.5	52.94	17.9
25	29.07	56.87	11.4
30	15.02	56.7	6.1

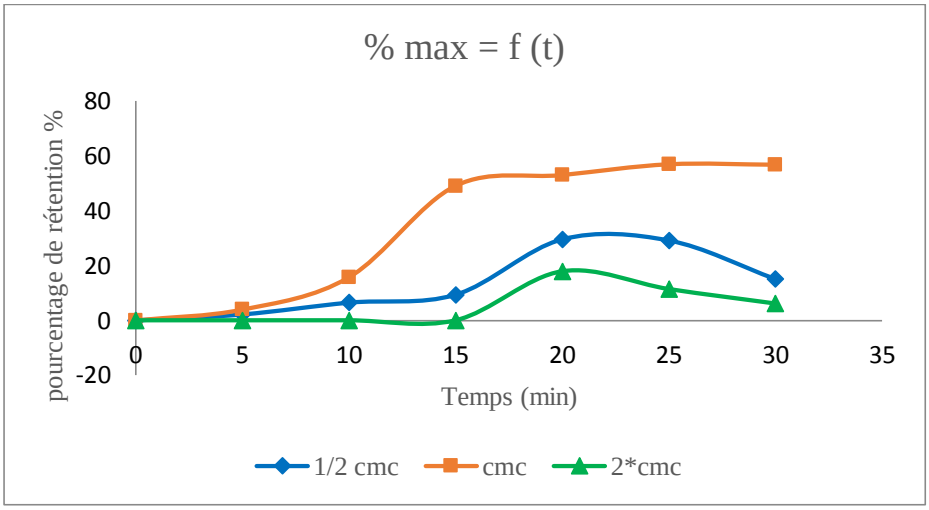


Figure III.25 : Effet de la concentration en biosurfactant sur le pourcentage de rétention de l'amoxicilline

D'après la figure III.24, on remarque que la meilleure diminution de la concentration résiduelle de l'amoxicilline est obtenue pour une charge en adsorbant correspondant à la concentration micellaire critique. Cependant, d'après la figure III.25, on constate que l'utilisation de quantités de biosurfactant supérieurs à la CMC diminue le rendement du traitement de 56.87% en utilisant une concentration en biosurfactant égale à sa CMC à 18.20 % en utilisant 2*CMC. Ceci est dû probablement à la saturation du milieu par le biosurfactant en cas de sa présence à haute concentration, ce qui défavorise le transfert de masse de l'adsorbat vers l'adsorbant. En outre, on note une diminution du temps de contact qui était de 25min en travaillant à la CMC jusqu'à à 15 min pour 2*CMC.

L'application du traitement au moyen du biosurfactant à une concentration inférieure à sa CMC (1/2 CMC) permet la rétention de l'effluent à un taux modéré de 29.50 %. Ceci peut être attribué à des interactions entre l'antibiotique et les monomères du biosurfactant.

- **Cas de l'ampicilline**

Les tableaux et les courbes représentant la variation de la concentration résiduelle de l'ampicilline ainsi que le taux de sa rétention par le biosurfactant sont représentés ci-dessous (Tableaux III.18 et III.19 et Figure III.26 et III.27).

Tableau III.18. Concentrations résiduelles d'ampicilline à différentes concentrations de biosurfactant

t (min)	C_r (mg/l)		
	0.012 (g/l)	**0.024 (g/l)**	**0.048 (g/l)**
0	40	40	40
5	27.5	32.22	38
10	22.5	14.36	36.36
15	21.25	13.84	32.45
20	13.75	12.3	32.39
25	18.75	12.23	36
30	33.75	17.32	37.36

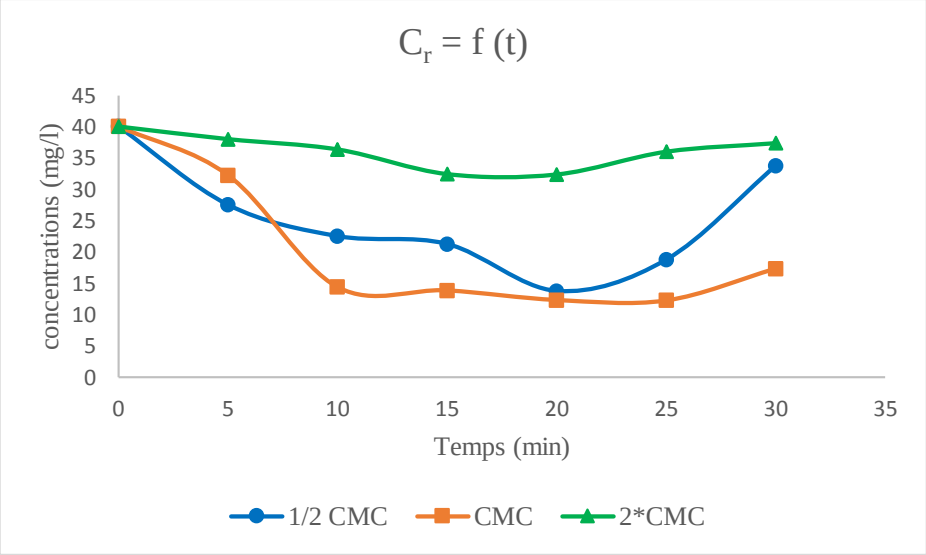


Figure III.26 : Effet de la concentration en biosurfactant sur l'élimination d'ampicilline

Tableau III.19. Pourcentage de rétention d'ampicilline à différentes concentrations de biosurfactant

t (min)	R (%)		
	0.012 (g/l)	**0.024 (g/l)**	**0.048 (g/l)**
0	0	0	0
5	31.25	19.44	5
10	43.75	64.1	9.08
15	46.87	65.38	18.86
20	65.62	69.23	19.01
25	53.12	69.41	10
30	15.62	17.32	6.66

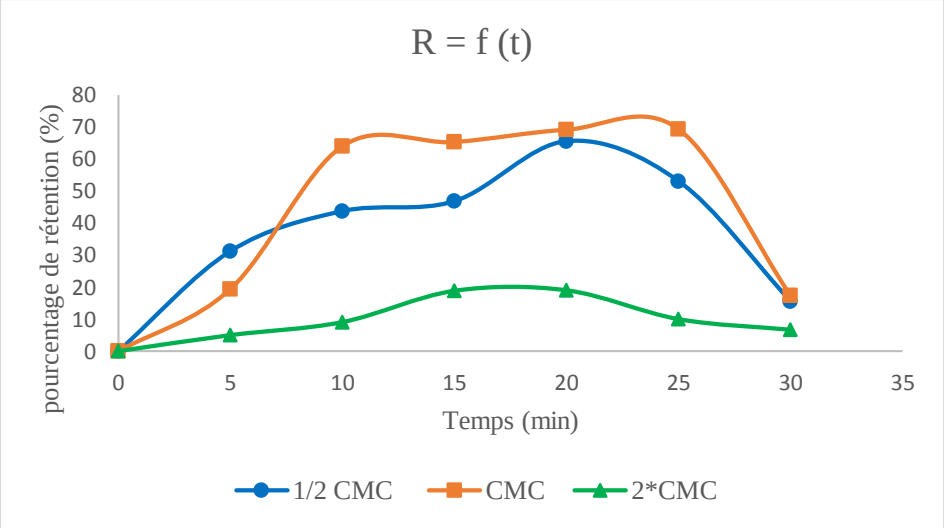


Figure III.27 : Effet de la concentration en biosurfactant sur le pourcentage de rétention de l'ampicilline

Du même que pour l'amoxicilline, le meilleure taux de rétention de l'ampicilline (69.41 %) est obtenu en appliquant un traitement au biosurfactant à une concentration égale à sa CMC.

- **Comparaison de l'effet de la vitesse d'agitation sur l'élimination des deux antibiotiques**

Les résultats obtenus ci-dessus ont permis de représenter le rendement maximal en fonction de la concentration en biosurfactant sur la figure III.28

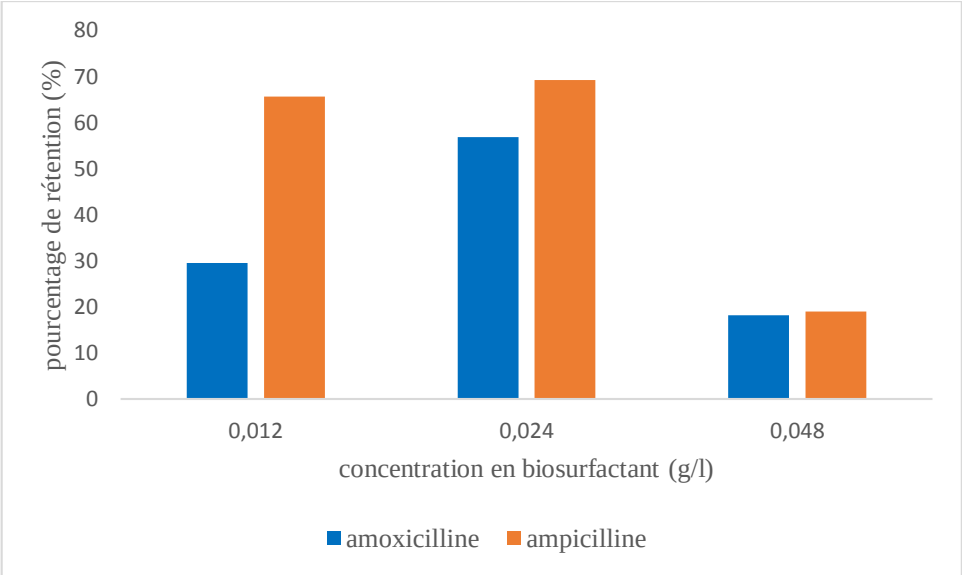


Figure III.28 : Rendement de l'adsorption des antibiotiques en fonction de la concentration en biosurfactant

D'après la figure III.28 on peut conclure que l'application du traitement au biosurfactant à une concentration correspondant à sa CMC permet une meilleure élimination d'effluent que ce soit dans le cas de l'amoxicilline ou de l'ampicilline.

III.4.4.2.4. Effet de la salinité

Dans le but de mieux comprendre l'influence des sels sur le processus d'adsorption d'antibiotique par le biosurfactant, les mêmes expériences ont été effectuées en ajoutant à chaque solution une quantité précise de KCl, $NaPO_3$, $CaCl_2$ et de NaCl.

- **Cas de l'amoxicilline**

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux (III.20 et III.21) et illustrés sur les figures (III.29 et III.30)

Tableau III.20. Concentrations résiduelles de l'amoxicilline en présence de différents sels

t (min)	C (mg/l)				
	Sans sel	**NaPO3**	**KCl**	**$CaCl_2$**	**NaCl**
0	40	40	40	40	40
5	38.43	33.04	34.89	33.41	37.81
10	33.72	29.56	25.96	24.94	25.77
15	20.39	15.65	19.57	23.53	23.64
20	18.82	8.69	19.59	23.06	23.51
25	17.25	10.43	20.21	25.88	26.38
30	17.32	20.87	24.13	26	32.62

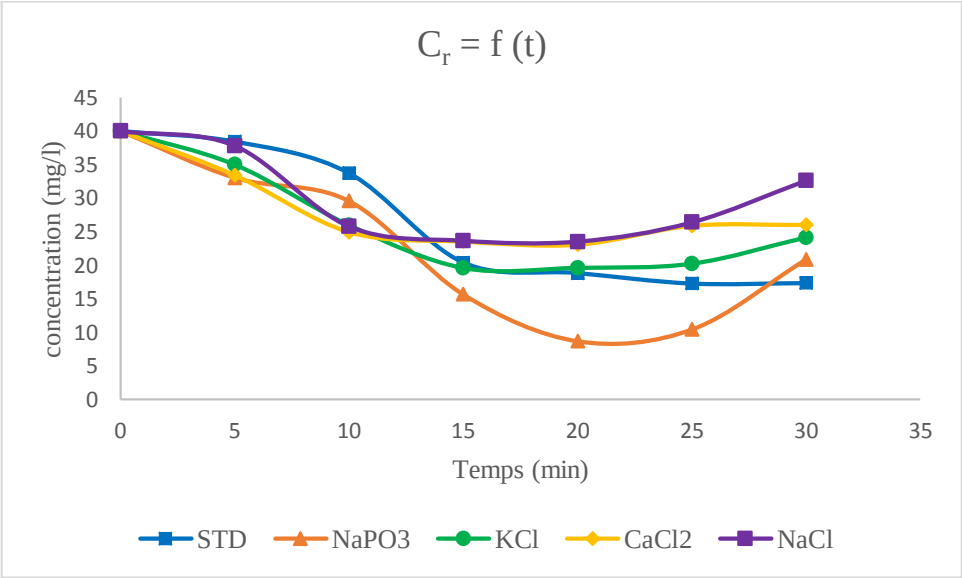


Figure III.29 : Effet de la salinité sur la concentration résiduelle d'amoxicilline

Tableau III.21. Pourcentage de rétention de l'amoxicilline en présence de différents sels

t (min)	R (%)				
	STD	**NaPO3**	**KCl**	**$CaCl_2$**	**NaCl**
0	0	0	0	0	0
5	3.92	17.39	12.76	16.47	5.67
10	15.69	26.08	35.1	37.64	35.57
15	49.02	60.86	51.07	41.17	41.35
20	52.94	78.26	51.02	42.35	41.27
25	56.87	73.91	49.47	35.29	34.05
30	56.7	47.82	39.67	35	18.45

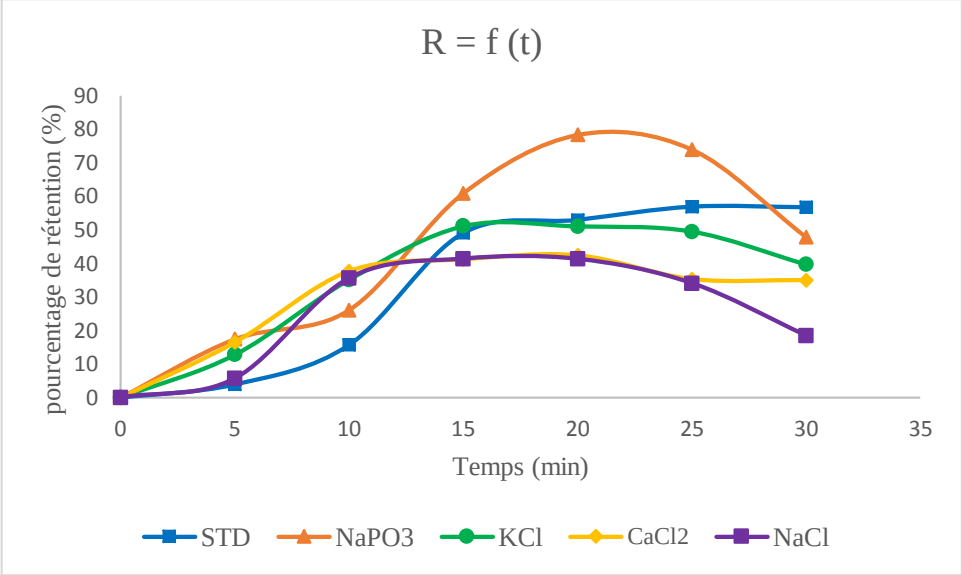


Figure III.30 : Effet de la salinité sur le pourcentage de rétention de l'amoxicilline

A la lumière des résultats trouvés, on remarque que le phosphate de sodium, augmente considérablement le taux de rétention de l'amoxicilline pour atteindre une valeur de 78.26% au bout de 20 min. L'effet du KCl permet d'avoir une réduction du temps de contact de 25 min à 15 min et diminue légèrement le taux de rétention de 56.87 à 51.07. Le NaCl et le $CaCl_2$, défavorisent l'élimination.

➢ **Cas de l'ampicilline**

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux (III.22 et III.23) et illustrés sur les figures (III.31 et III.32)

Tableau III.22. Concentrations résiduelles de l'ampicilline en présence de différents sels

T (min)	C (mg/l)				
	Sans sel	**$CaCl_2$**	**$NaPO_3$**	**KCl**	**NaCl**
0	40	40	40	40	40
5	32.22	36.76	24.52	33.33	30.94
10	14.36	36.76	20.64	30	25.66
15	13.84	34.59	15.48	22.32	16.47
20	12.3	16.22	14.19	15.45	16.52
25	12.23	6.48	25.8	16.12	24.9
30	17.32	6.48	26	32.22	26.41

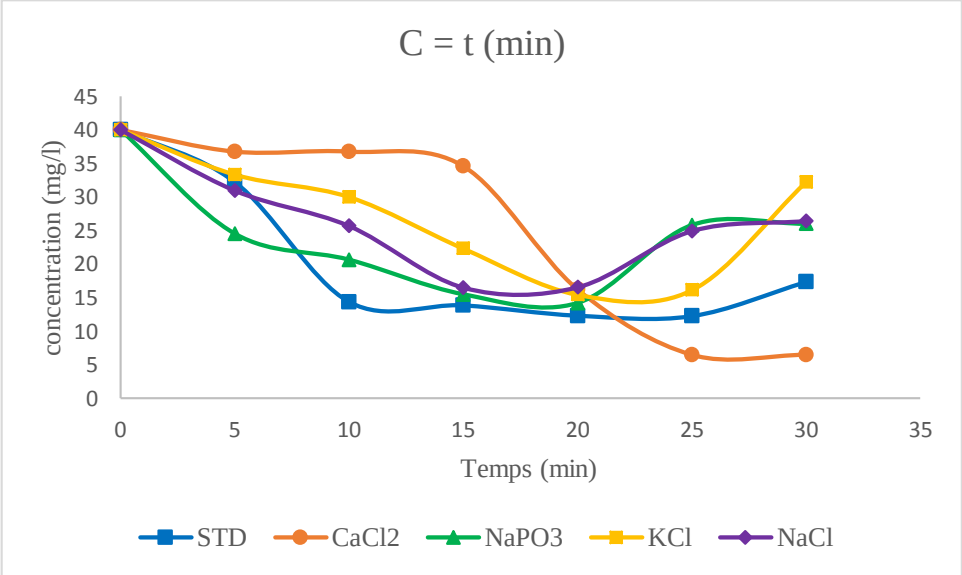


Figure III.31 : Effet de la salinité sur la concentration résiduelle d'amoxicilline

Tableau III.23. Pourcentage de rétention de l'ampicilline en présence de différents sels

t (min)	R (%)				
	Sans sel	**$CaCl_2$**	**$NaPO_3$**	**KCl**	**NaCl**
0	0	0	0	0	0
5	19.44	8.10	38.7	16.6	22.64
10	64.1	8.50	48.38	25	35.84
15	65.38	13.51	61.21	44.2	58.82
20	69.23	59.45	64.51	61.11	58.7
25	69.41	83.78	35.48	59.7	33.96
30	17.32	83.78	36	19.44	24.9

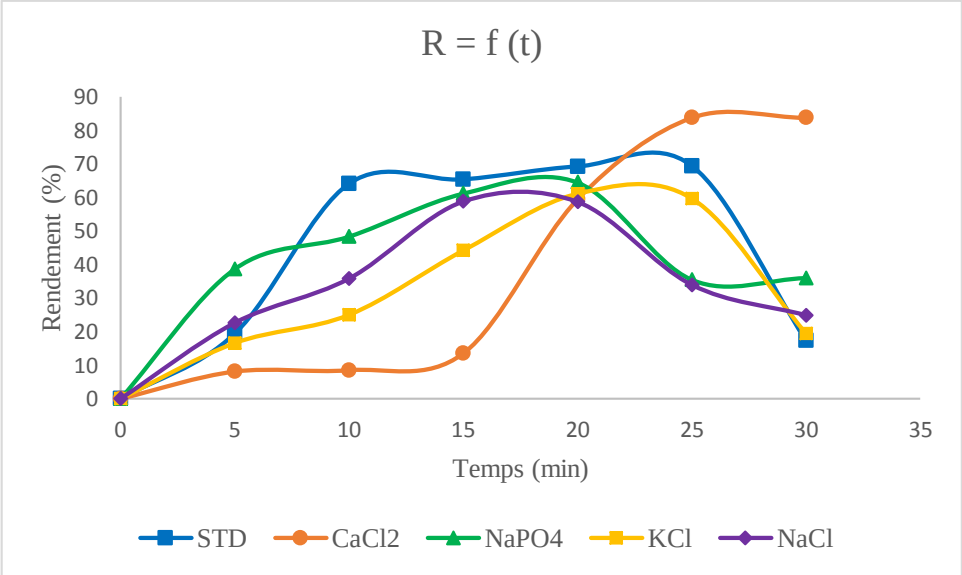


Figure III.32 : Effet de la salinité sur le pourcentage de rétention de l'ampicilline

L'étude de l'influence des sels sur le rendement d'adsorption des antibiotiques montre que le $CaCl_2$ a un effet positif et améliore nettement le taux de rétention jusqu'à atteindre un pourcentage de 83.7% alors que les autres sels entrainent une légère diminution du taux de rétention de l'ampicilline de l'ordre de 69.41 % en absence de sel , 64.51% en présence de NaPO3, 61.11% en présence du KCl et 58.82 % en présence du NaCl.

- **Comparaison de l'effet de sels sur l'élimination des deux antibiotiques**

La figure III.33 regroupe les résultats concernant l'effet de sels sur la rétention de chacun des deux effluents étudiés, en l'occurrence, l'amoxicilline et l'ampicilline.

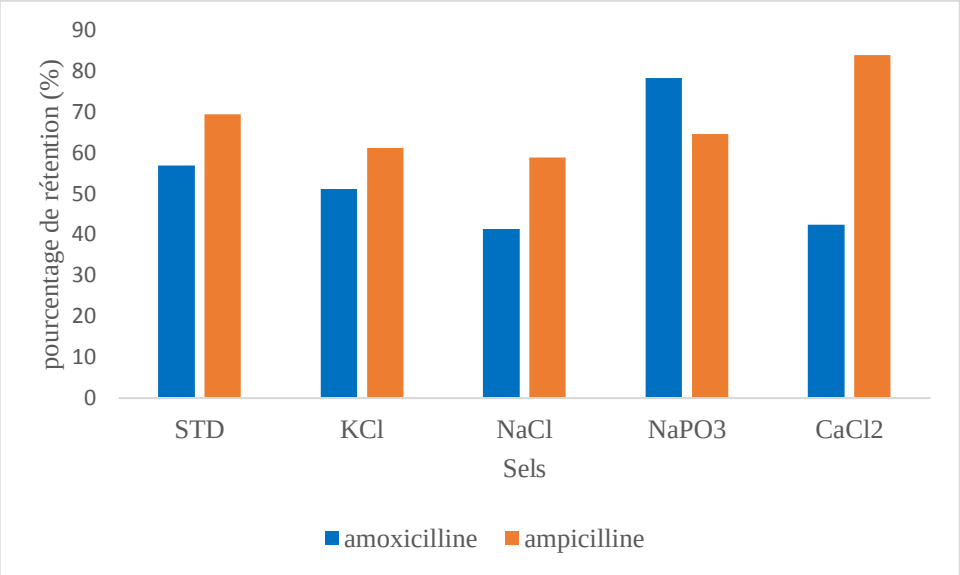


Figure III.33 : Rendement de l'adsorption des antibiotiques en fonction du sel ajouté

En réalité selon les résultats certains sels favorisent considérablement l'adsorption. Cependant dans les milieux salins la concentration en biosurfactant a une influence considérable sur la réactivité de celui-ci. Car les sels entre en compétition avec le biosurfactant pour les ions hydroniums librés dans le milieu ce qui affecte l'adsorption.

III.4.4.2.5. Effet du *pH*

Le *pH* est un facteur important dans toute étude d'adsorption, l'effet du *pH* a été envisagé en variant le *pH* de 3 à 9 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique HCl (0,1N) ou de la soude NaOH (0,1N).

➢ **Cas de l'amoxicilline**

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux (III.24 et III.25) et illustrés sur les figures (III.34 et III.35)

Tableau III.24. Concentrations résiduelles de l'amoxicilline à différents pH

t (min)	C_r (mg/l)			
	3	**5**	**7**	**9**
0	40	40	40	40
5	36.55	37.73	38.43	36.5
10	34.18	35.47	33.72	31.5
15	33.79	33.86	20.39	24.5
20	33.83	33.92	18.82	19.5
25	35.16	35.11	17.25	19.71
30	35.85	36.12	17.32	22.86

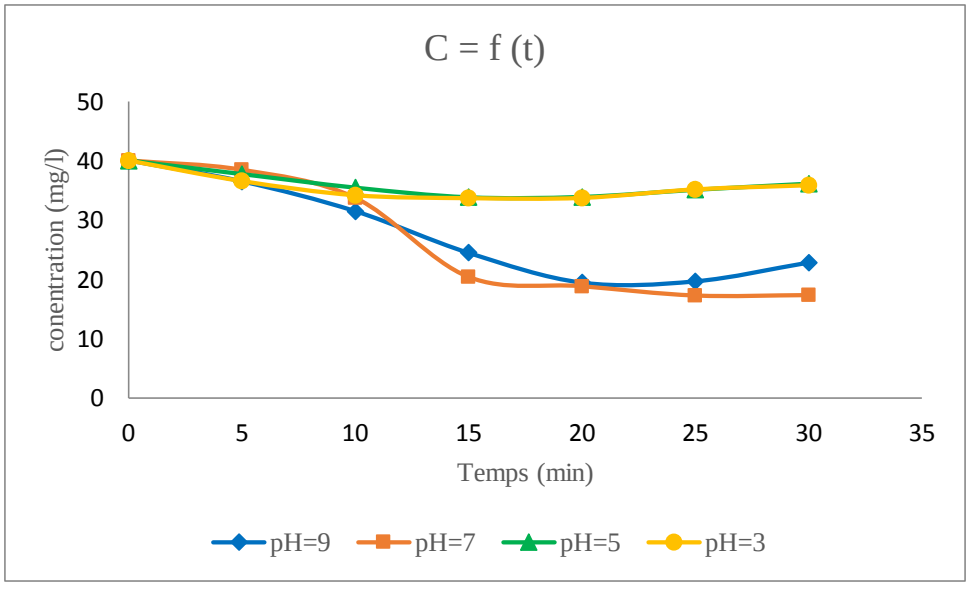


Figure III.34 : Effet du pH sur la concentration résiduelle d'amoxicilline

Tableau III.25. Pourcentages d'élimination de l'amoxicilline à différents *pH*

t (min)	R (%)			
	3	**5**	**7**	**9**
0	0	0	0	0
5	8.62	5.66	3.92	8.75
10	13.79	11.32	11.69	21.25
15	15.51	15.35	49.02	38.75
20	15.42	15.20	52.94	51.25
25	12.10	12.22	56.86	51.02
30	10.37	9.70	56.7	42.85

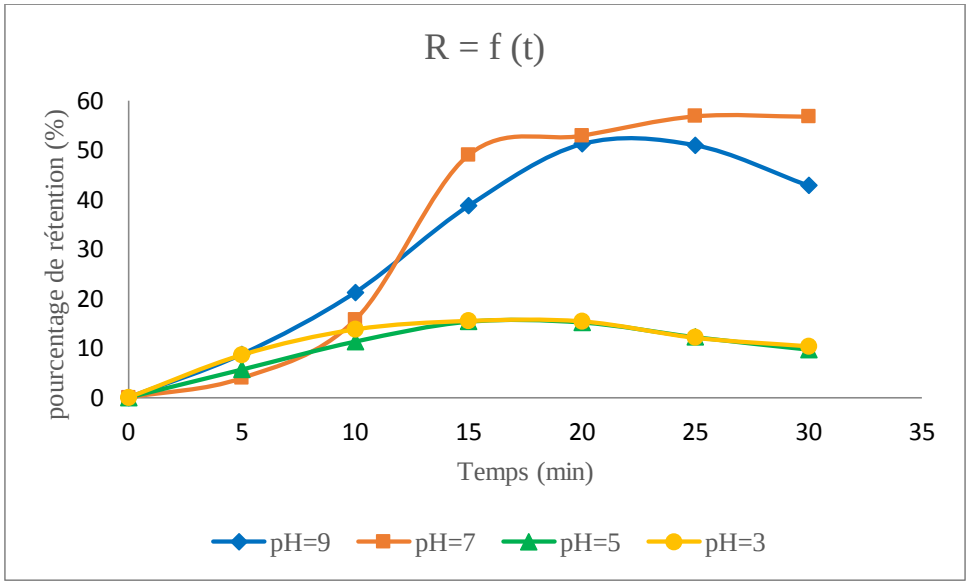


Figure III.35 : Effet du *pH* sur le pourcentage de rétention de l'amoxicilline

La figure III.35 montre l'effet du milieu sur le taux de rétention de l'amoxicilline par le biosurfactant. En effet, l'adsorption est favorisée en milieu neutre qui se traduit par une augmentation du taux de rétention jusqu'à atteindre un pourcentage de 56.86 %. Pour un milieu acide et aux *pH* 3 et 5 une rétention de 15% a été obtenue.

Pour un milieu basique, à *pH* 9, on remarque une légère diminution du taux de rétention est de 51% (figure III.36).

➢ **Cas de l'ampicilline**

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux (III.26 et III.27) et illustrés sur les figures (III.36 et III.37)

Tableau III.26. Concentrations résiduelles de l'ampicilline à différents *pH*

t (min)	C (mg/l)			
	pH = 3	**pH = 5**	**pH = 7**	**pH = 9**
0	40	40	40	40
5	36.52	37.09	32.22	32
10	35.65	35.64	14.36	28.23
15	34.78	26.93	13.84	27.5
20	34.78	24.34	12.3	27.1
25	37.39	24	12.23	26.66
30	37.4	26.36	17.32	27.88

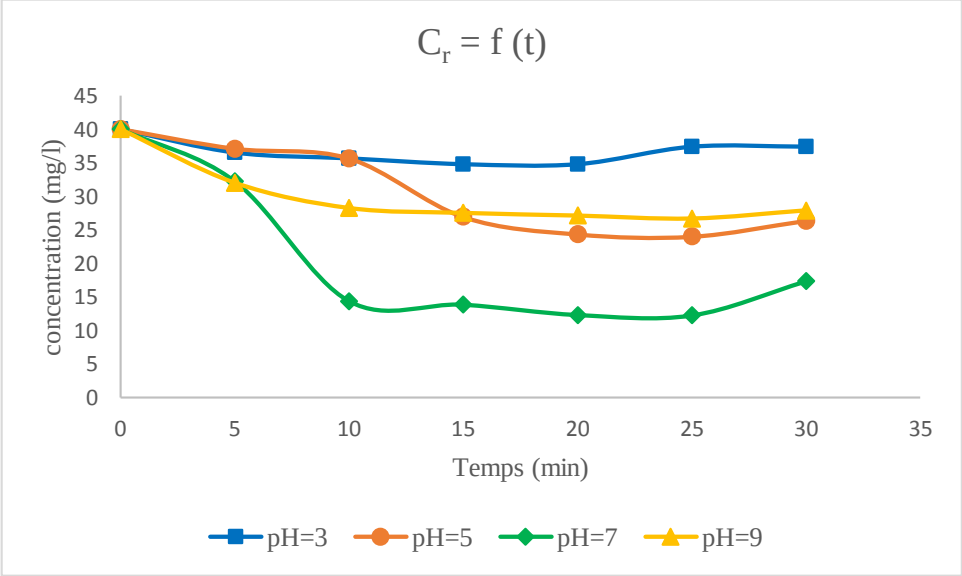


Figure III.36 : Effet de *pH* sur la concentration résiduelle de l'ampicilline

Tableau III.27. Pourcentages d'élimination de l'ampicilline à différents *pH*

t (min)	R (%)			
	pH = 3	**pH = 5**	**pH = 7**	**pH = 9**
0	0	0	0	0
5	8.69	7.27	19.44	20
10	10.87	10.9	64.1	29.41
15	13.04	32.72	65.38	31.25
20	13.04	39.18	69.23	32.25
25	6.52	40	69.41	33.33
30	6.5	34.1	17.32	30.3

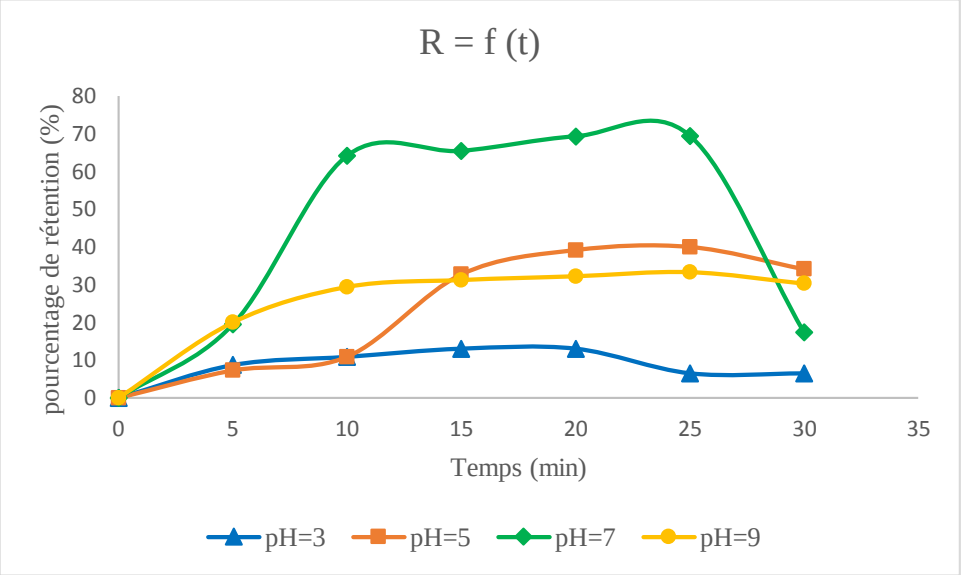


Figure III.37 : Effet de *pH* sur le pourcentage de rétention de l'ampicilline

A partir de la figure III.37, on remarque que pour les *pH* allant de 3 à 7, le taux d'élimination augmente considérablement de 13.04 % à 69.41 %. A *pH* 9 une chute du rendement a été observée, elle est estimée à 33.33.

- **Comparaison de l'effet du pH sur l'élimination des deux antibiotiques**

L'histogramme III.38 donne le pourcentage d'élimination des antibiotiques en fonction du *pH*. Au vu des résultats trouvés, on peut conclure que la capacité d'adsorption est recommandée pour le cas de l'amoxicilline et l'ampicilline à pH neutre.

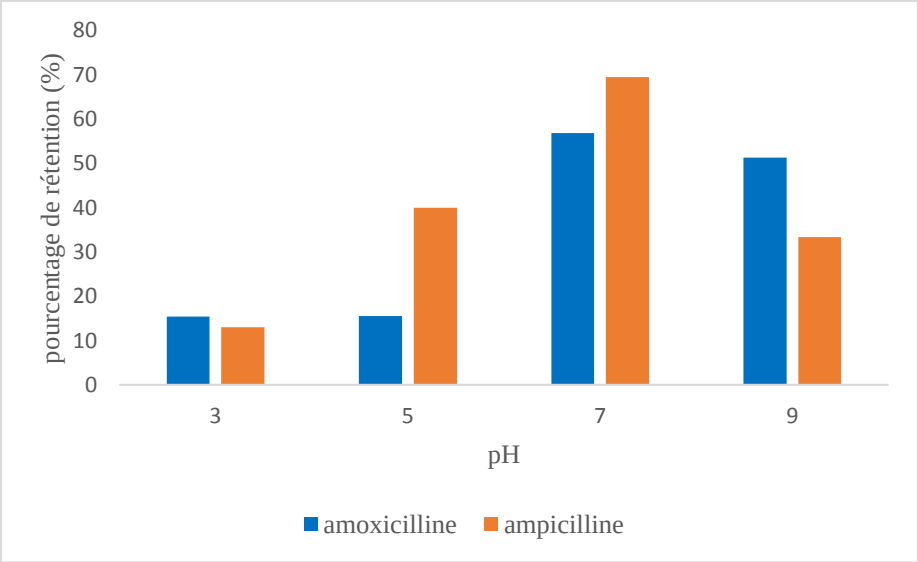


Figure III.38 : pourcentages de rétentions maximales à différentes pH

III.4.2.2.6. Effet de la température

L'effet de la température sur le rendement d'adsorption des antibiotiques a été envisagé. Pour ce faire, trois températures ont été testées : 20, 30 et 40 °C.

- **Cas de l'amoxicilline**

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux (III.28 et III.29) et illustrés sur les figures (III.39 et III.40)

Tableau III.28. Concentrations résiduelles de l'amoxicilline à différents températures

t (min)	C (mg/l)		
	20 °C	**30 °C**	**40 °C**
0	40	40	40
5	38.43	38.86	38.82
10	33.72	32.94	35.92
15	20.39	30.28	36.06
20	18.82	30.01	36.65
25	17.25	32.16	37.4
30	17.32	34.28	39.4

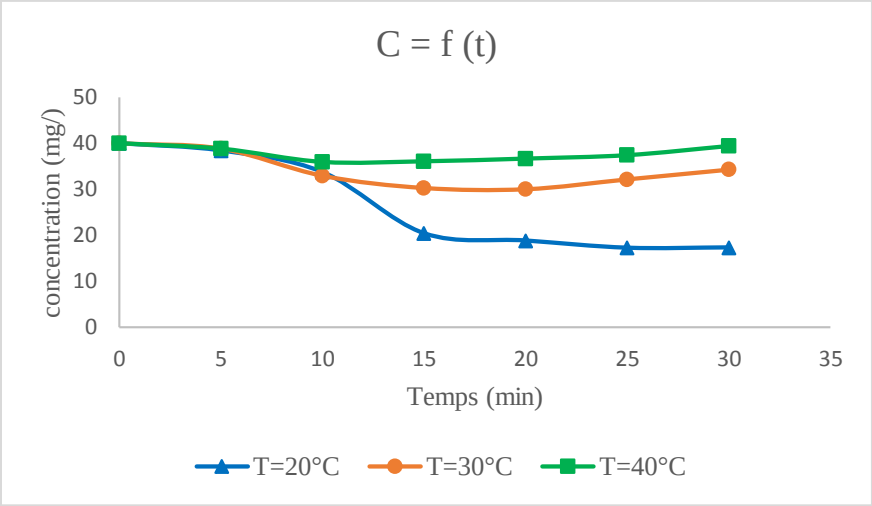


Figure III.39 : Effet de la température sur la concentration résiduelle d'amoxicilline

Tableau III.29. Pourcentages d'élimination de l'amoxicilline à différents températures

t (min)	R (%)		
	20	**30**	**40**
0	0	0	0
5	3.92	2.85	2.93
10	15.69	17.67	10.18
15	49.02	24.28	9.84
20	52.94	24.97	1.55
25	56.86	19.6	0.86
30	56.7	14.3	0.65

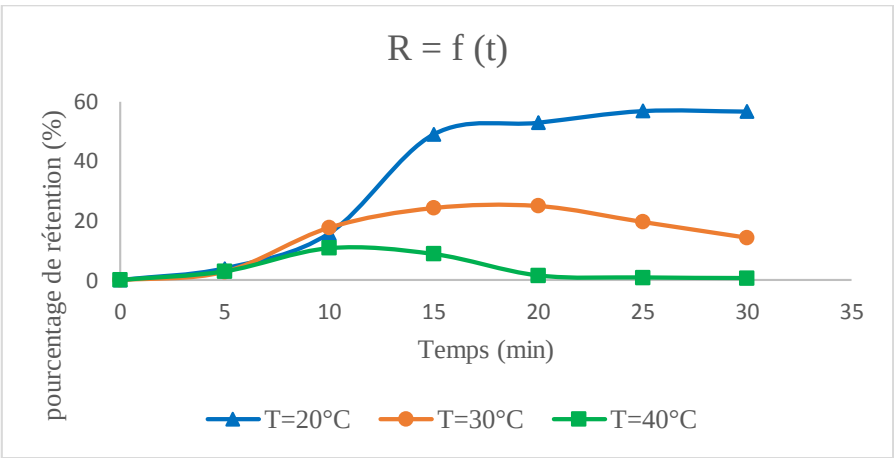


Figure III.40 : Effet du pH sur le pourcentage de rétention de l'amoxicilline

La figure III.39 montre l'effet de la température sur la concentration résiduelle d'amoxicilline. A la lumière des résultats trouvés, on peut dire que l'adsorption est favorisée à température ambiante 20°C, Ceci se traduit par une obtention d'une grande quantité d'antibiotiques adsorbée. Aussi, ce résultat est confirmé par l'analyse du taux de rétention qui montre une augmentation du rendement d'adsorption de l'amoxicilline à cette température qui est de l'ordre de 56.86% (figure III.40). Un faible rendement a été observé pour des températures plus élevées.

- **Cas de l'ampicilline**

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux (III.30 et III.31) et illustrés sur les figures (III.41 et III.42)

Tableau III.30. Concentrations résiduelles de l'ampicilline à différents températures

t (min)	**C (mg/l)**		
	20 °C	**30 °C**	**40 °C**
0	40	40	40
5	32.22	35	36.59
10	14.36	32.5	35.71
15	13.84	28.75	38
20	12.3	28.75	39.26
25	12.23	33.75	37.16
30	17.32	38.75	37.44

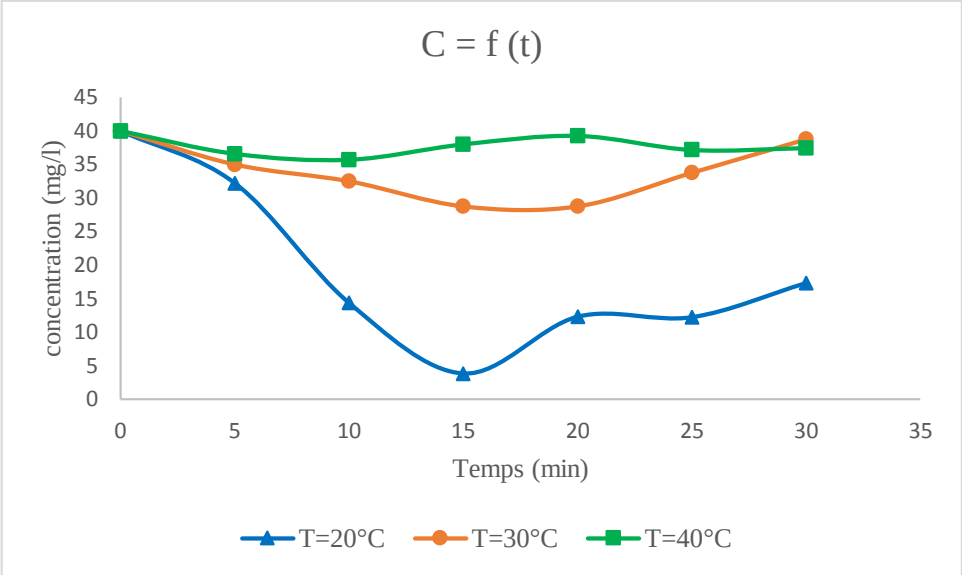


Figure III.41 : Effet de la température sur la concentration résiduelle d'ampicilline

Tableau III.31. Pourcentages d'élimination de l'ampicilline à différents températures

t (min)	R (%)		
	20 °C	**30 °C**	**40 °C**
0	0	0	0
5	19.44	12.5	8.52
10	64.1	18.75	10.71
15	65.38	28.12	4.98
20	69.23	28.12	1.84
25	69.41	15.52	0.71
30	17.32	3.12	0.64

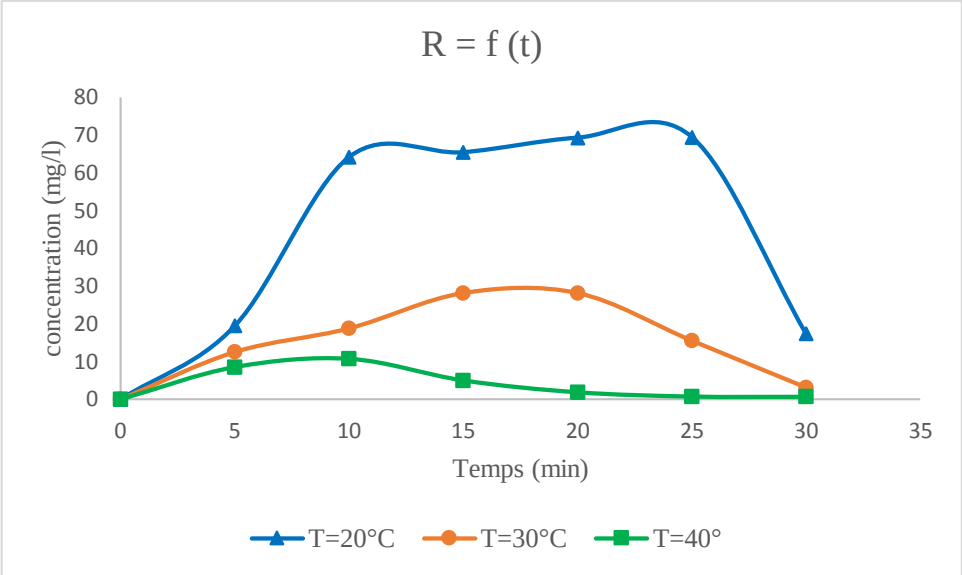


Figure III.42 : Effet de la température sur le pourcentage de rétention de l'ampicilline

➢ **Comparaison de l'effet de la température sur l'élimination des deux antibiotiques**

La comparaison entre le rendement maximal obtenu en variant la température est schématisée ci-dessous (figure III.43).

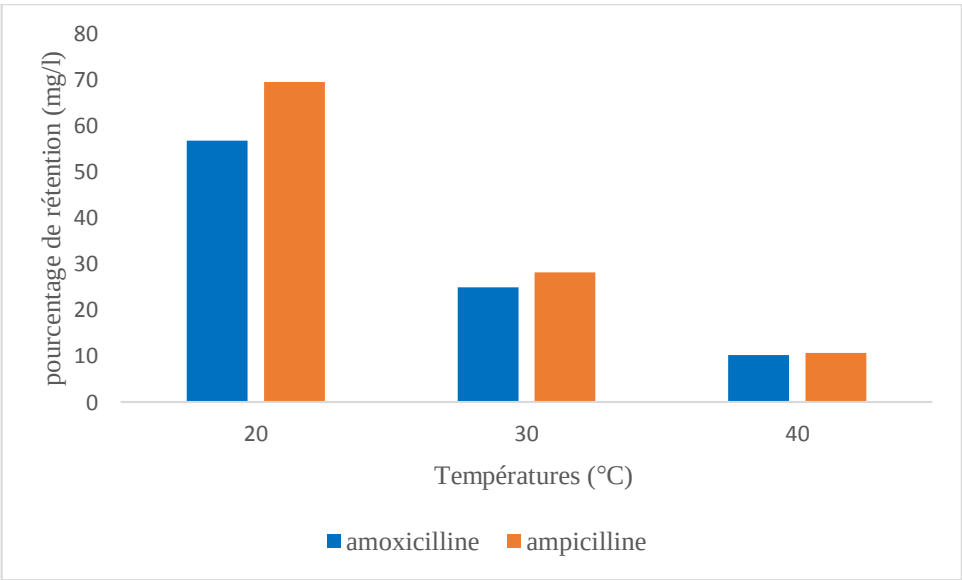


Figure III.43 : Pourcentages de rétentions maximales à différentes températures

Nous pouvons conclure que la température de 20°C est considérée comme optimale pour favoriser l'élimination de chacun des antibiotiques au moyen du biosurfactant.

III.4.5. Modélisation des cinétiques d'adsorption

Le modèle cinétique permet de tirer le mécanisme d'adsorption et les étapes contrôlant la vitesse d'adsorption. Les principaux modèles cinétiques rapportés dans la littérature pour l'évaluation des données cinétiques expérimentales sont : pseudo-premier ordre, pseudo-second ordre, Elovich et diffusion interparticulaire.

1. Modèle cinétique de pseudo-premier ordre

Lorsque l'adsorption est précédée par une diffusion à travers une couche limite, la cinétique suit l'équation de vitesse de pseudo-premier ordre ayant pour forme :

$$\frac{dq_1}{dt} = k_1(q_e - q_t)$$

L'intégration de l'équation précédente avec les conditions aux limites : $t = 0 \rightarrow t$ et $q_t = 0 \rightarrow q_t$ donne : $q_t = q_e\left(1 - \frac{1}{e^{k_1 t}}\right)$

La transformation en forme logarithmique donne :

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1 t}{2.303}$$

Où

q_e : capacité d'adsorption à l'équilibre (mg/g).

q_t : capacité d'adsorption à l'instant t (mg/g).

k_1: la constante de vitesse de pseudo-premier ordre (min^{-1}).

Les coefficients du modèle de pseudo-premier ordre (q_e et k_1) peuvent être obtenus à partir du tracé linéaire de $\log(q_e - q_t)$ en fonction de t.

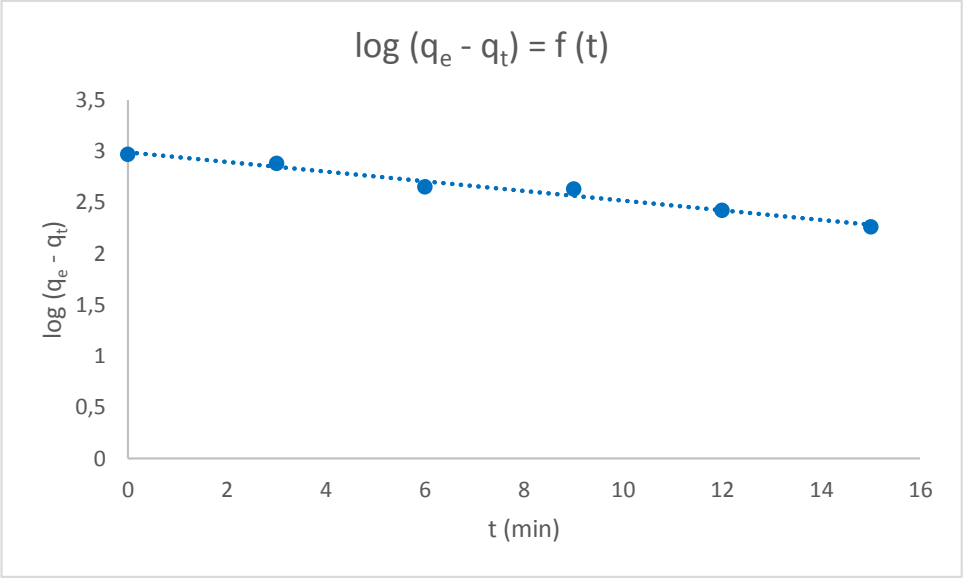


Figure III. 44 : Linéarisation du modèle du pseudo premier ordre

Tableau III.32. Résultats de la régression linéaire du modèle du pseudo premier ordre

K1	Q_e	R^2
0.11	977.24	0.99

La figure III.44 et la valeur de R^2 mentionné dans le tableau III.32 montre que les résultats expérimentaux obtenus suivent parfaitement la variation linéaire donnée par l'équation représentative d'une cinétique de pseudo premier ordre.

2. Modèle cinétique de pseudo-second ordre

Le modèle de pseudo-second ordre est un modèle cinétique couramment utilisé dont la forme générale est donnée par :

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

L'intégration de l'équation avec les mêmes conditions aux limites que l'équation (I.14) donne :

$$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$$

La linéarisation de cette équation donne :

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}$$

Où

k_2 : la constante de vitesse de pseudo-second ordre ((g/mg min)).

Les coefficients du modèle de pseudo-second ordre (q_e et k_2) peuvent être obtenus à partir du tracé linéaire de t/q_t en fonction de t.

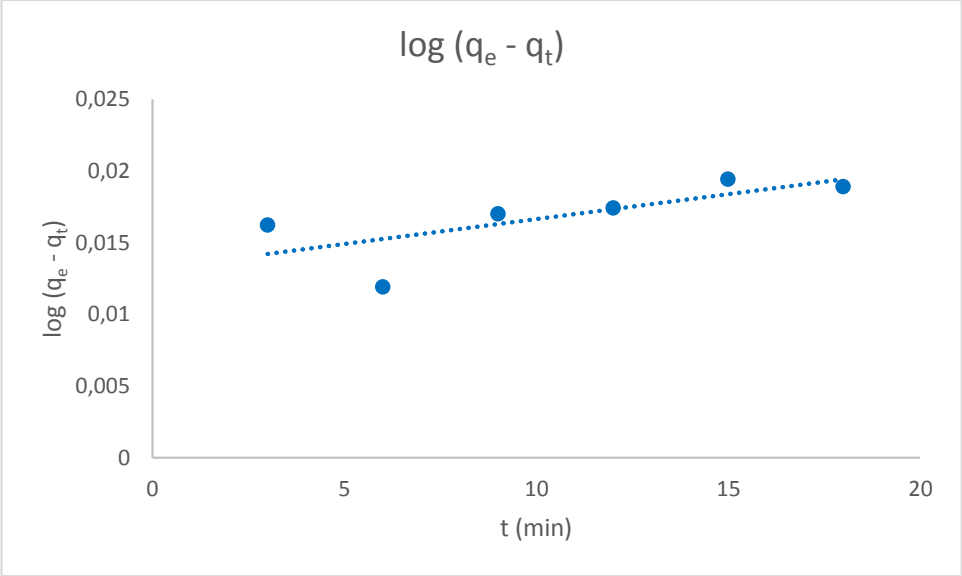


Figure III.45 : Linéarisation du modèle du pseudo second ordre

Tableau III.33. Résultats de la régression linéarisation du modèle du pseudo second ordre

K_2	Q_2	R^2
$6.82\ 10^{-6}$	3333	0.729

D'après la figure III.45, il est clair que le modèle cinétique de pseudo second ordre n'est pas applicable dans le cas de la rétention de l'amoxicilline et l'ampicilline par le biosurfactant.

3. Modèle d'Elovich

Ce modèle qui a été envisagé pour décrire une cinétique de second-ordre en assumant que les sites d'adsorption sont énergétiquement hétérogènes est donné par :

$$\frac{dq_t}{dt} = \alpha \exp\left(-\beta . q_t\right)$$

L'intégration de l'équation donne :

$$q_t = \beta \ln(\alpha\beta) + \beta \ln t$$

Où

α : la vitesse initiale d'adsorption (mg/g min).

β : la constante de désorption (g/mg).

Les coefficients du modèle d'Elovich (α et β) peuvent être obtenus à partir du tracé linéaire de q_t en fonction de ln(t).

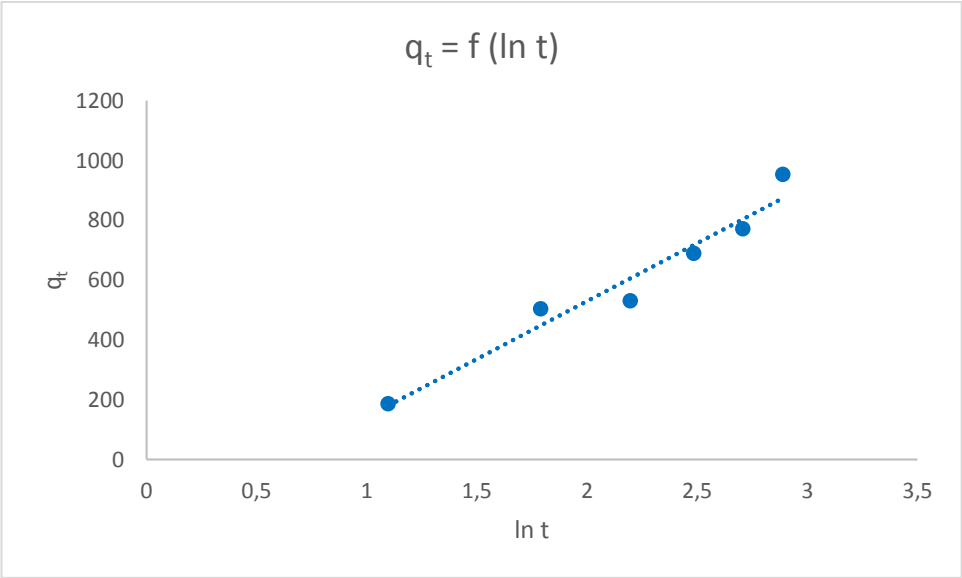


Figure III.46 : Linéarisation du modèle d'Elovich

Tableau III.34. Résultats de la régression de la linéarisation du modèle d'Elovich

A	β	R^2
0.0014	388.14	0.975

Les résultats de la régression présentés ci-dessus montrent que le modèle d'Elovich peut être applicable dans le cas de la rétention de l'amoxicilline et l'ampicilline par le biosurfactant.

4. Modèle de diffusion intra particule

La diffusion interparticulaire contrôle la plupart des processus d'adsorption. Dans ce cas, l'élimination varie presque proportionnellement avec la racine carrée du temps et peut être représentée comme suit :

$$q_t = k_{di} t^{1/2} + C \qquad \text{(I.22)}$$

Où

k_{di} : constante de vitesse de diffusion interparticulaire (mg/g $min^{1/2}$)

C : épaisseur de la couche limite.

Les coefficients de ce modèle (k_{di} et C) peuvent être obtenus à partir du tracé linéaire de q_t en fonction de $t^{1/2}$. Ainsi, la résistance au transfert de masse externe augmente avec l'augmentation de l'ordonnée à l'origine qui s'annule la diffusion interparticulaire est la seule étape limitant la vitesse d'adsorption.

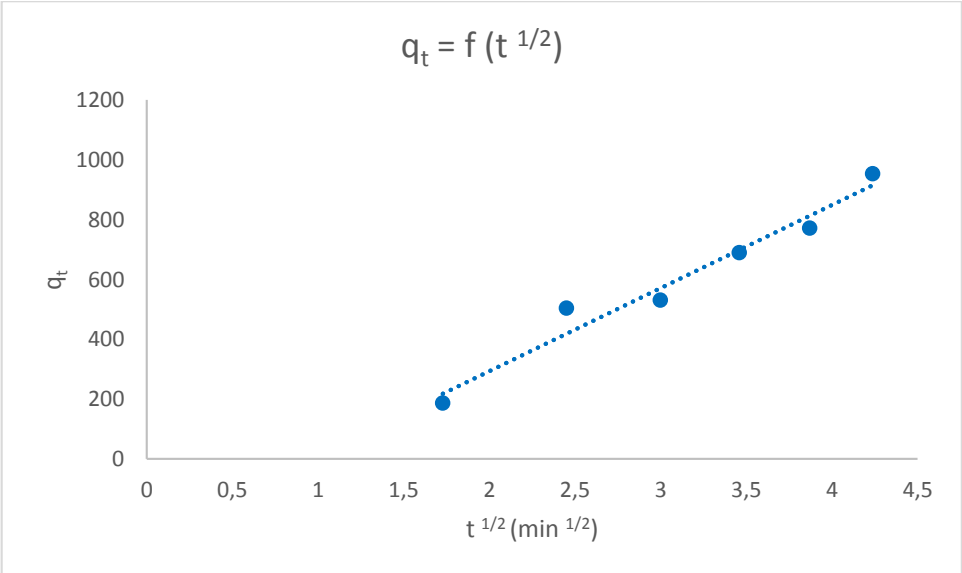


Figure III.47 : Linéarisation du modèle de modèle de diffusion intra particule

Tableau III.35. Résultats de la régression linéaire du modèle de diffusion intra particule

K_{di}	C	R^2
277.69	263.52	0.980

La figure III.47 et les valeurs des coefficients apportés dans le tableau III.35 montre que le modèle de diffusion intra particule est valide pour l'adsorption des deux antibiotiques par le biosurfactant.

III.4.6. Utilisation du biosurfactant pour le traitement des milieux complexes

Pour s'approcher aux milieux aquatiques réelles, l'étude été accomplis par des tests sur un milieu complexe contenant les deux antibiotiques amoxicilline et ampicilline.

- **Traitement du milieu complexe sans ajout de sel**

Une solution d'antibiotique (amoxicilline + ampicilline) de 0.04 g/l a été préparée. Une quantité de biosurfactant correspondante à la concentration utilisée (C=0.024 g/l) a été ajouté à la solution. Le mélange a été mis sous agitation à une vitesse de 400 trs/min. une suivie cinétique a été effectuée en analysant des échantillons de la phase résiduelle par HPLC chaque 5 min.

L'exploitation des chromatogrammes obtenus (Voir Annexe) a permis de tire les résultats expérimentaux regroupés dans les tableaux (III.36) et illustrés sur les figures (III.48 et III.49)

Tableau III.36. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant

t (min)	Amoxicilline		Ampicilline	
	C (mg/l)	R (%)	C (mg/l)	R (%)
0	0.04	0	0.04	0
5	0.0306	23.60	0.0294	26.43
10	0.0284	28.89	0.0268	33.00
15	0.0271	32.23	0.0215	46.31
20	0.0248	38.00	0.0199	50.24
25	0.0242	39.50	0.0196	51.02

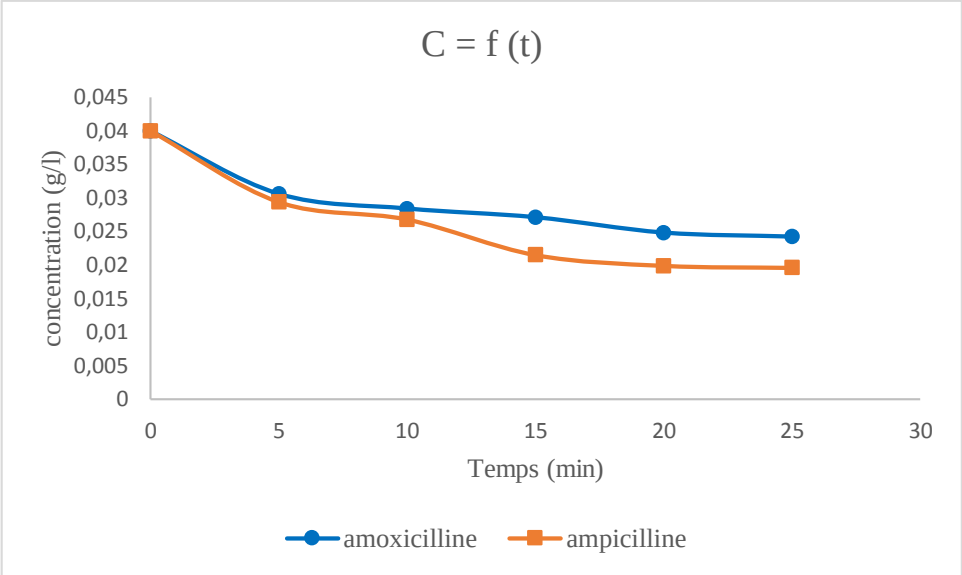


Figure III.48. Concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant

En examinant la concentration résiduelle des antibiotiques en milieu complexe (Figure III.48), on observe une diminution en fonction du temps jusqu'à atteindre un palier d'équilibre au bout d'un temps de contact de 20 min.

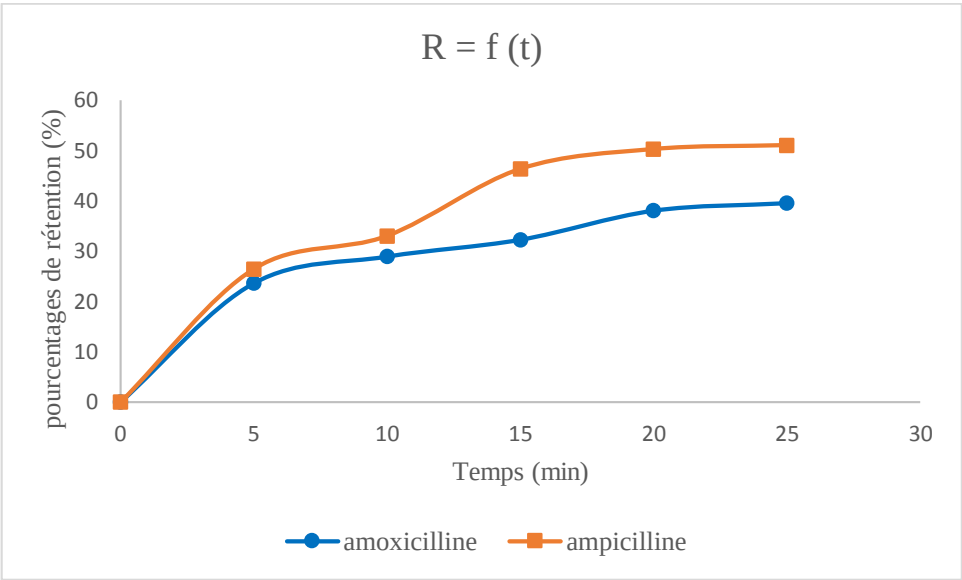


Figure III.49. Pourcentage de rétention d'antibiotiques éliminés par le biosurfactant

La figure III.49 indique que l'ampicilline s'adsorbe mieux que l'amoxicilline avec des taux de rétention de 39.5 et 51.02%, respectivement.

- **Traitement du milieu complexe avec l'ajout de sel**

Le même essai présenté précédemment a été effectué avec l'ajout d'un sel $NaPO_3$

L'exploitation des chromatogrammes obtenus (Voir Annexe) a permis de tire les résultats expérimentaux regroupés dans les tableaux (III.37) et illustrés sur les figures (III.50 et III.51)

Tableau III.37. Concentrations résiduelles et pourcentages de rétentions d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant

T (min)	Amoxicilline		Ampicilline	
	C (mg/l)	R (%)	C (mg/l)	R (%)
0	0.04	0	0.04	0
5	0.0328	17.99	0.0368	7.97
10	0.0286	28.49	0.0268	33.00
15	0.0232	42.12	0.02149	46.26
20	0.02023	49.42	0.01736	56.6
25	0.0189	52.78	0.0134	66.42
30	0.0184	54.05	0.0122	69.47

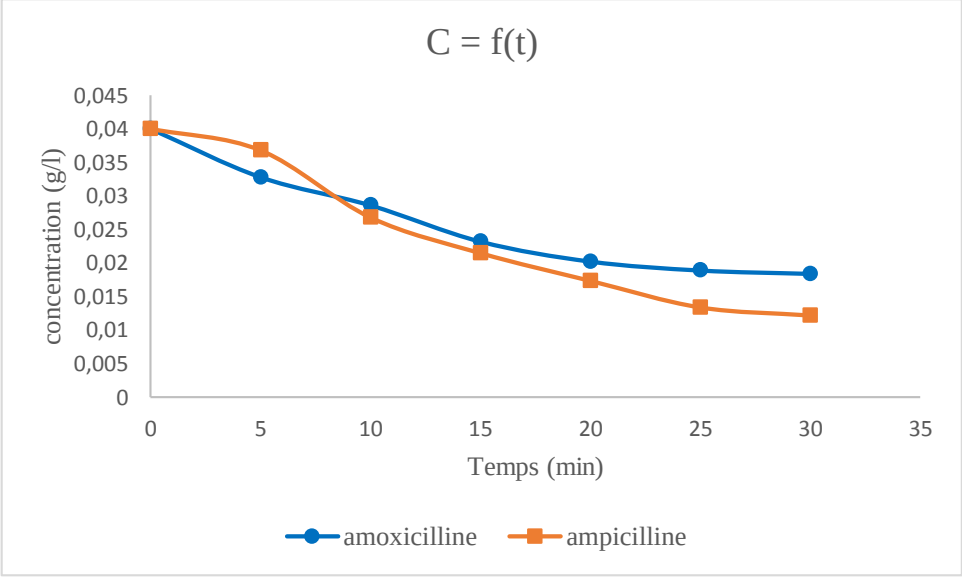


Figure III.50. Concentrations résiduelles d'antibiotiques éliminées par le biosurfactant

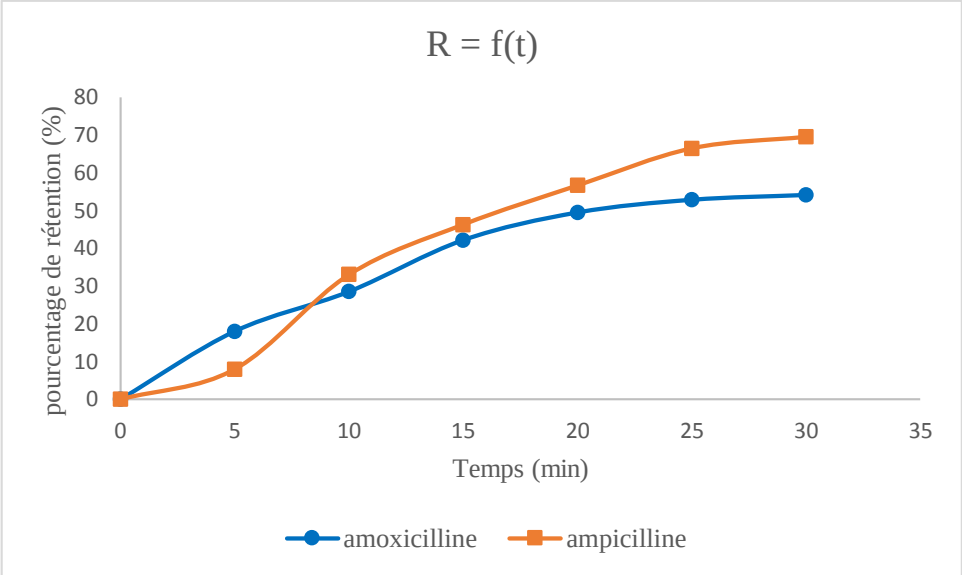


Figure III.51. Pourcentage de rétention d'antibiotiques éliminés par le biosurfactant

Les résultats illustrés ci-dessus permettent de conclure que le phosphate de sodium améliore l'efficacité du biosurfactant utilisé pour l'élimination des deux antibiotiques amoxicilline et ampicilline à des taux de 54.05 et 69.47%, respectivement.

Ce résultat confirme l'efficacité du biosurfactant utilisé à traiter le milieu pollué complexe proposé.

CONCLUSION GENERALE

L'utilisation massive des antibiotiques génère une libération importante de ces molécules dans l'environnement. La présence de ces contaminants dans les milieux aquatiques représente un risque potentiel pour les écosystèmes et la santé humaine.

Cette étude qui s'inscrit dans le cadre du traitement des effluents pharmaceutiques et industriels, a pour objectif d'éliminer les deux antibiotiques : amoxicilline et ampicilline au moyen d'un tansioactif naturel (biosurfactant) synthétisé au niveau de laboratoire de recherche de biomatériaux et phénomènes de transport (LBMPT).

Les résultats obtenus ont montré que le biosurfactant présente une bonne efficacité de rétention des antibiotiques, avec un taux de rétention de 56.86 % pour l'amoxicilline et de 69.41 % pour l'ampicilline respectivement et ce au bout d'un temps de contact de 25 min.

Afin de montrer l'influence des différents paramètres physicochimiques, Une étude paramétrique a été réalisée et a permis de tirer les conclusions suivantes :

- La vitesse d'agitation qui permet l'adsorption d'une plus grande quantité d'effluent est de 400 trs/min
- La concentration en antibiotique correspondant au meilleur taux de rétention est de 0.04 g/l.
- la meilleure rétention d'antibiotique est obtenue pour une concentration en biosurfactant correspondant à sa concentration micellaire critique qui est égale à 24 mg/l.
- La présence des sels affecte le traitement appliqué ainsi le $NaPO_3$ favorise l'élimination de l'amoxicilline alors que le $CaCl_2$ favorise celle de l'ampicilline.
- la rétention des antibiotiques est favorisée à pH neutre.

L'étude de la cinétique d'adsorption des antibiotiques par le biosurfatant montre qu'elle obeit au modèle de pseudo premier ordre avec un coefficient de corrélation de 0.99.

Pour s'approcher aux milieux aquatiques réels, l'étude été accomplis par des tests sur un milieu complexe contenant les deux antibiotiques amoxicilline et ampicilline. Les résultats confirment l'efficacité du biosurfactant utilisé à traiter le milieu pollué complexe proposé avec des taux de traitement 54.05 % et 69.47 % pour l'amoxicilline et l'ampicilline respectivement.

Cette étude ouvre certains nombre de perspectives relatives à la recherche des procédés alternatives de traitement des effluents complexes sur large gamme des polluants organiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abalos A., Pinazo A., Infante M. R., Casals M., Garcia F et Manresa A., (2001), Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17 (5) :1367- 1371.

Abouzlam Manhal (2014)**,** optimisaton d'un proceed de traitement des eaux par ozonation catalytique. Thèse de doctorat, Université de Poitiers, France.

Andreozzi, R., M. Raffaele and P. Nicklas (2003), Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. Chemosphere 50(10): 1319-1330.

Arino S., Marchal R. et Vandecasteele J.P., (1996), Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species, Applied Microbiology and Biotechnology. 45: 162-168

Balcıoglu, I.A., Otker,M., (2003), Treatment of pharmaceutical waste water containing antibiotics by O3 and O3/H_2O_2 processes. Chemosphere 50,85e 95.

Barraud Olivier (2011), Intégrons de résistance et pression de sélection antibiotique. Thèse de doctorat, Université de Limoges, France.

Besse Jean Philippe (2010), Impact environnemental des médicaments à usage humain sur le milieu récepteur : évaluation de l'exposition et des effets biologiques pour les écosystèmes d'eau douce. Thèse de doctorat, Université de Metz – UFR SCI.F.A.

Boillot Cotide (2008), Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Thèse de doctorat, École Doctorale de Chimie de Lyon.France

Bonot Sébastien (2010), Persistance et dissémination du plasmide pB10, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines. Thèse de doctorat, Université Henri Poincare.France

Brown K. D., Kulis J., Thomson B., Chapman T. H. & Mahwidey D. B. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. Science of the Total Environment. 366, 772 – 783

Capdeville Marion Justine (2011), Étude des cycles biogéochimique des contaminants organiques dits « émergents » dans les systèmes. Thèse de Doctorat, Université Bordaux 1.

Carballa M., Fink G., Omil F., Lema J.M., Ternes T. (2007), Determination of solid-water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragantes in digested sludge. Water research. Article in press. Water Research, 38 (2004), 2918-2926.

Chassagne Claire (2012), Caractérisation phénotypique de souches d'entérobactéries produisant une oxacillinase-48 isolées lors d'une épidémie survenue au CHU de Nancy en 2009/2011. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.France

Chenini Halima (2007), Etude de la dégradation par voie photochimique de polluant organique « Orange G » en milieu aqueux homogène et hétérogène. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine. Algérie

Christofi N. et Ivshina I.B., (2002), A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. Journal of Applied Microbiology. 93 : 915-929.

Clara M, Sternn B. & Kreuzinguer N (2004), Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during ground water infiltration. Water Research. 38, 947 – 954.

Damez celine (2006), Transformation d'agro-ressources régionales et étude de leurs propriétés amphiphiles, thèse de doctorat, université de Reims. France

Delgado Luis Fernando (2009), Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux : élimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. France

Desai J. D. et Banat I. M., (1997)**,** Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61 (1) : 47-64

Dinh M. Quoc-Tuc, (2012), Transferts et comportements d'antibiotiques à l'échelle du bassin versant élémentaire. Thèse de doctorat. Ecole pratique des hautes études en partenariat avec l'Université Pierre et Marie Curie. France

Dirany Ahmed (2010), Études cinétique et mécanistique d'oxydation/minéralisation des antibiotiques sulfaméthoxazole (SMX), amoxicilline (AMX) et sulfachloropyridazine (SPC) en milieux aqueux par procédés électrochimiques d'oxydation avancée. Mesure et suivi d'évolution de la toxicité lors du traitement. Thèse de doctorat. Université Paris-est école doctorale SIE.

Djerbaoui Amina Nesrine (2011),Utilisation de souches bactériennes antichtones dans la production de biosurfactant et la bioremediation des sols de Hassi Messoud contaminés par les hydrocarbures. Memoire de magister. Université Kasdi Mrbah-Ouargla. Algerie

Edwards D. A., Luthy R.G. et Liu Z., (1991), Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions, Environ. Science and Technology. 25 : (1), 127- 133

El Khabbaz Hatim (2008), Traitement des solutions modèles du lait par des membranes de nanofiltration et d'osmose inverse. Thèse de doctorat. Université Mohamed 5 AGDAL. Maroc.

El molla, E.S., Chaudhuri,M., (2011) The feasibility of using combined TiO2 photocatalysis-SBR process for antibiotic waste water treatment. Desalination journal 272, 218-224.

Gabet S., (2004).Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique.Thèse de doctorat de l'université de Limoges, France.

Gobel A., Mcardell C. S., Joss A., Siegrist H. & Giger W. (2007). Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. Science of the Total Environment. 372, 361–371.

Guergouri Ibtissem (2010), Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants. Mémoire de magister. Université Mentouri de Constantine.Algerie

Guerra-Santos L. H., Kappeli O. et Fiechter A., (1986), Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* contonuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Applied. Microbiologyand Biotechnoly 24 : 443-448

Haddou Menana (2010), Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène : procédés Fenton, photo-Fenton et photocatalyse. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. France

Hamouche Aksas (2013), Etude cinétique et thermodynamique de l'adsorption des métaux lourds par l'utilisation des adsorbants naturels. Thèse de doctorat. Université de Boumerdes, Algerie.

Hernando, M., M. Mercua, A. Fernandez-Alba and D. Barcelo (2006), Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. Talanta. 69 : 334-342.

Hollender,J.,Zimmermann,S.G.,Koepke,S.,Krauss,M.,McArdell,C.S.,Ort,C.,Singer,H.,vonGu nten,U.,Siegrist,H., (2009), Elimination of organic micropollutants in a municipal waste water treatment plant upgraded with a full -scalepost- ozonation followed by sand filtration. Environmental Science and Technology 43, 7862-7869

Holmberg, K. (2001). Natural surfactants. Current Opinion in Colloid & Interface Science. **6**: 148-159.

Huang X. F., Guan W., Liu J., Lu L. J., Xu J. C., Zhou Q., (2010),Characterization and Phylogenetic Analysis Of Bio demulsifier-Producing Bacteria, Bioresource Technology. **Vol.101**, p.317–323.

Idder Salima (2012), État de la contamination des eaux du département de la Dordogne par les résidus de médicaments. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1, France.

Jones, O. A. H., N. Voulvoulis and J. N. Lester (2002), Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. Water Research. 36(20): 5013-5022.

Kemper N. (2008), Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecological Indicators 8, 1 – 13.

Khemili Souad (2008)**,** Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister, université de Boumerdes, Algérie

Kim S., Cho J., Kim In S., Vanderford B. J., Snyder S.A (2007), Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. Water Research 41 (2007), 1013 – 1021.

Kolpin D. W., Furlong E. T., Meyer M. T., Thurman E. M., Zaugg S. D., Barber L. D. & Buxton H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Environmental Science & Technology 36, 1202 – 1211.

Kosutı´c,K.,Dolar,D.,Asperger,D.,Kunst,B.,(2007), Removal of antibiotics from a model waste water by RO/NF membranes. Separation and Purification Technology 53, 244-249

Larpent J.P. (2000). «Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens». Edition Techniques et Documentation. pp 28.

Li, Yang M., Hu J., Zhang Y., Chang H. & Jin F. (2011). Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. Water Research. 42, 307 – 317.

Looser M. O., Parriaux A. & Bensimon M. (1999). Landfill underground pollution detection and characterization using inorganic traces. Water Research 33, 3609 – 3616.

Mata Sandoval J. C., Karns J. et Torrents A., (2000). Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides, Environment Science and Technology. 34 (23) : 4923-4930.

Marqués A.M., Pinazo A., Farfan M., Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A., Manresa A., Espuny M.J., (2009)**,** The Physicochemical Properties And Chemical Composition Of Trehalose Lipids Produced By *Rhodococcuserythropolis*51T7, Chemestry. Physical journal.

Vol.158, p.110–117

Mcardell C. S, Molnar E., Suter M. J.-F. & Giger W. (2003). Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland Environnemental. Science & Technology 37, 5479 – 5486.

Merouani Djillali Redha (2011), Traitement de colorants azoique et anthraquinonique par procedes d'oxydation avancée (POA). Thèse de doctorat. Université des sciences et de technologie de Lille et Université de Mostaganem Algérie,

Mesli Esma (2013), Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez Acinobacter baumannii. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen.Algerie

Michael I, Rizzo L, McArdell C.S,Manaia C.M, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Fatta-Kassinos (2012), Urban waste water treatment plants as hot spots for the release of antibiotics in the environment : A review, water research

Miège C., Choubert J. M., Ribeiro L., Eusèbe M. & Coquery M. (2009), Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first result. Environmental Pollution 157, 1721 – 1726.

Naddeo,V.,Meric,S.,Kassinos,D.,Belgiorno,V.,Guida,M., (2009), Fate of pharmaceuticals in contaminated urban wastewater effluent under ultrasonic irradiation.Water Research 43, 4019-4027

Nagranaik P., Batt A. &Boulanger B. (2011). Source characterization of nervous system active pharmaceutical ingredients in healthcare facility wastewaters. Journal of Environmental Management. 92, 872 – 877

Nogueira duarte (2005), Extraction à deux phases aqueuses à l'aide d'alcools polyethoxyles en vue de l'élimination de l'élimination de polluants organiques et d'ions métalliques. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

Prommachan O., (2002), Production and application of biosurfactant from *Bacillus* MUV4, Master of science thesis of biotechnology, Prince of songkla university, Thailland. 70 p

Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, J. L, Budzinski, H., Elbaz-Poulichet, F (2006), Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized Mediterranean catchments. Environmental Sciences & Technology. 40, 5282-5288.

Savard Pierre-Yves (2008), Caractérisation structurale et dynamique de la Beta-lactamase TEM-1 de la bactérie *ESCHERICHIA COLI* par RMN liquide. Doctorat de thèse, Université Laval de Québec. Canada

Sim W.-J., Lee J.-W., Lee E.-S., Shin S.-K., Hwang S.-R. & OH J.-E. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. Chemosphere 82, 179 – 186.

Ternes, T.A., Meisenheimer, M., Mcdowell, D., Brauch, H.J., Brigitte, H.G., Preuss, G., William, U., Zulei-Seibert, N (2002), Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. Environment Science and Technology. 32, 3245 – 3460.

Van Dyke M.I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee et J.T. Trevors (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil, Canadian journal of Microbiology **39**: 1071-1078

Velichkova Filipa Aleksandrova (2014), Vers un procédé Fenton hétérogène pour le traitement en continu d'eau polluée par des polluants pharmaceutiques. Thèse de doctorat, Université de Toulouse. France

Watkinson, A.J., Murby, E.J., Costanzo, S.D., (2007) Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. Water Research 18 (2007), 4164-4176.

West C.C. ET Harwell J.H., (1992), Surfactants and subsurface remediation, Environment Science and Technology. 36 (12) : 2324-2330.

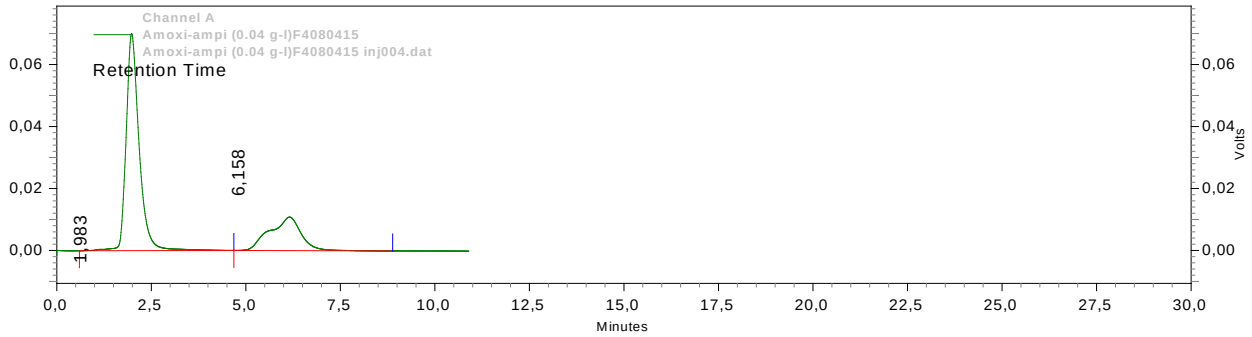
Yuan,F.,Hu,C.,Hu,X.,Wie,D.,Chen,Y.,Qu,J.,(2011), Photo degradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H2O2 process. Journal of Hazardous Materials 185, 1256-1263

Zaviska Francois (2011), Modélisation du traitement de micropolluants organiques oxydation éléctrochimique. Thèse de doctorat. Université du Québec, Canada

ANNEXE

A. Chromatogrammes de l'étude de la cinétique d'élimination sans ajout de sel

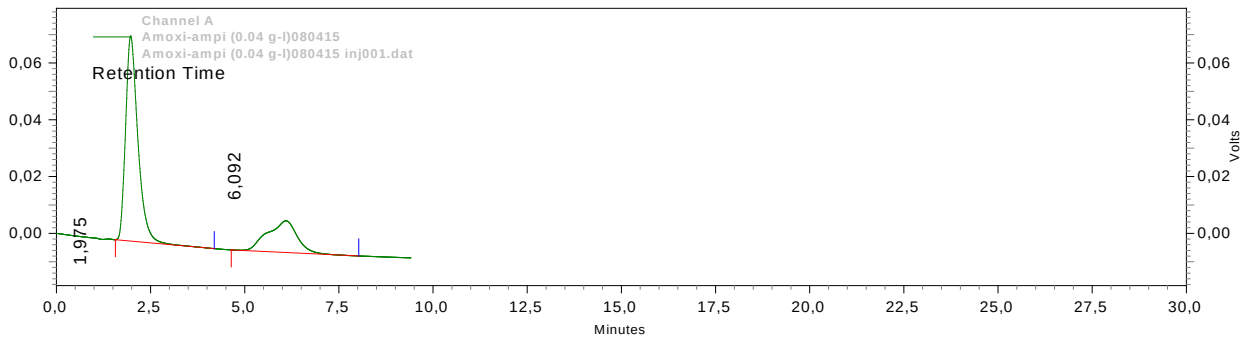
- **t = 5 min**



Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,983	1675104	72,912	69996	86,614
2	6,158	622341	27,088	10818	13,386
Totals		2297445	100,000	80814	100,000

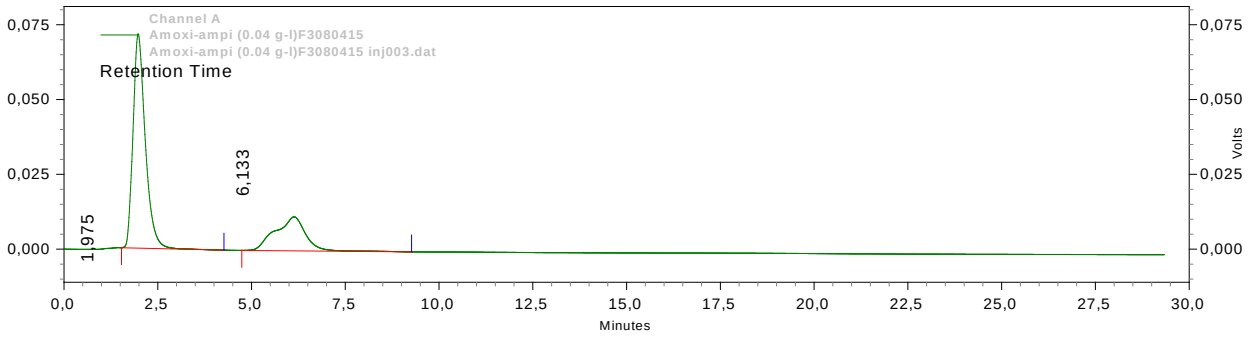
- **t = 10 min**



Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,975	1635537	72,916	72234	86,609
2	6,092	607511	27,084	11168	13,391
Totals		2243048	100,000	83402	100,000

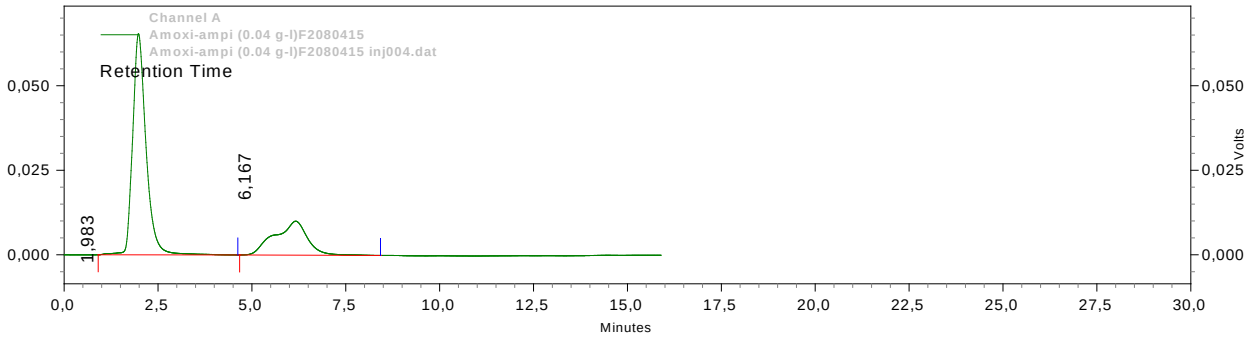
- **t = 15 min**



Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,975	1626673	71,819	71547	86,308
2	6,133	638284	28,181	11350	13,692
Totals		2264957	100,000	82897	100,000

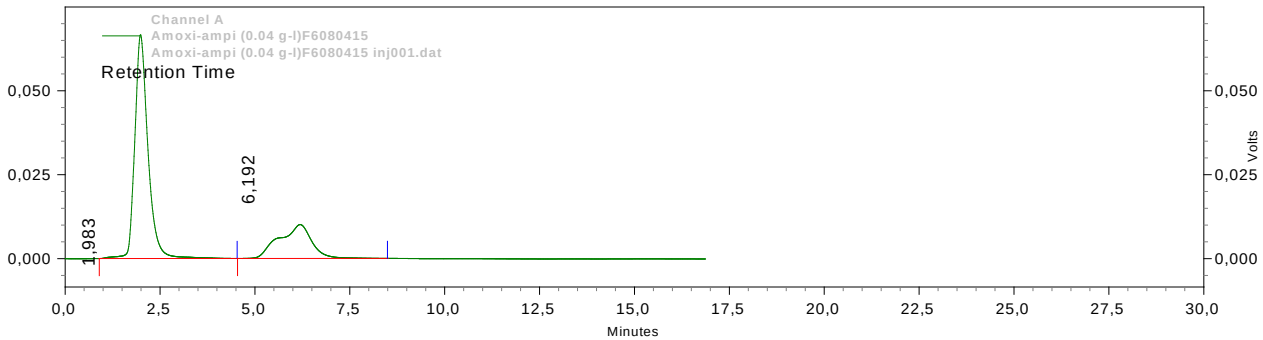
- **t = 20 min**



Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,983	1621067	72,647	65374	86,685
2	6,167	610356	27,353	10042	13,315
Totals		2231423	100,000	75416	100,000

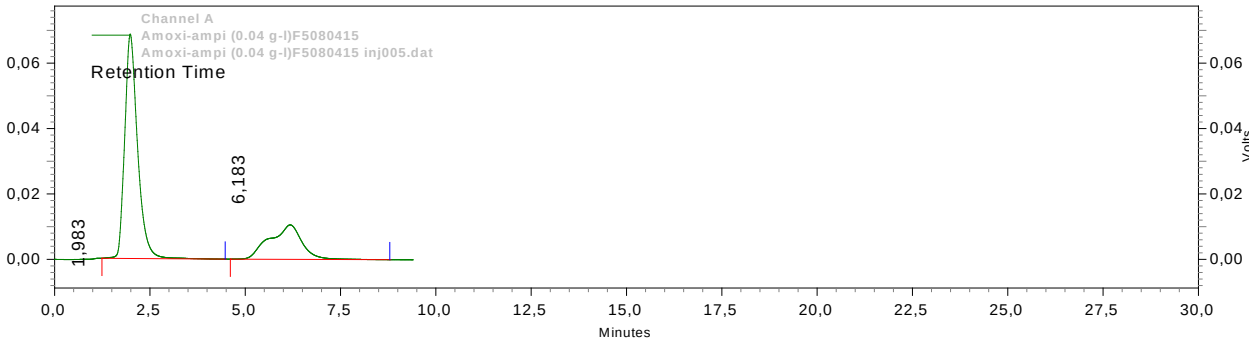
- **t = 25 min**



Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,983	1611389	72,926	66598	86,842
2	6,192	598222	27,074	10091	13,158
Totals		2209611	100,000	76689	100,000

- **t = 30 min**

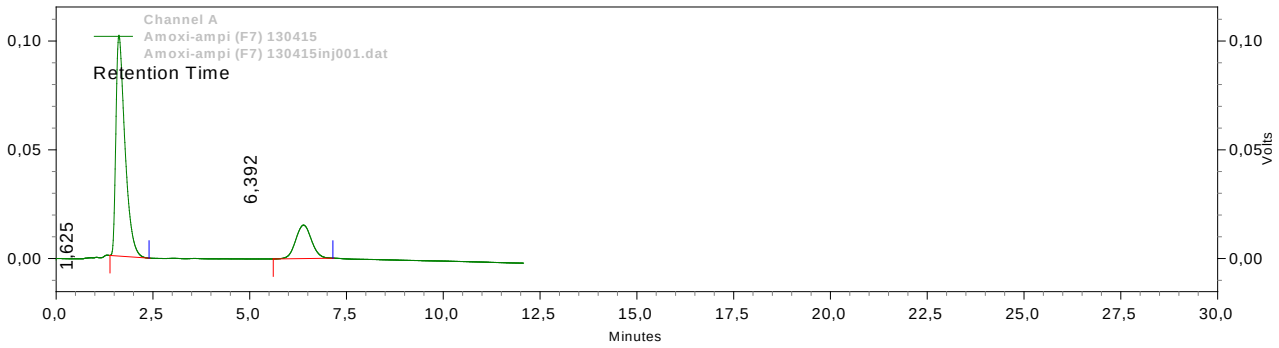


Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,983	1608878	72,236	68577	86,685
2	6,183	618380	27,764	10534	13,315
Totals		2227258	100,000	79111	100,000

B. Chromatogrammes de l'étude de la cinétique d'élimination avec ajout de $NaPO_3$

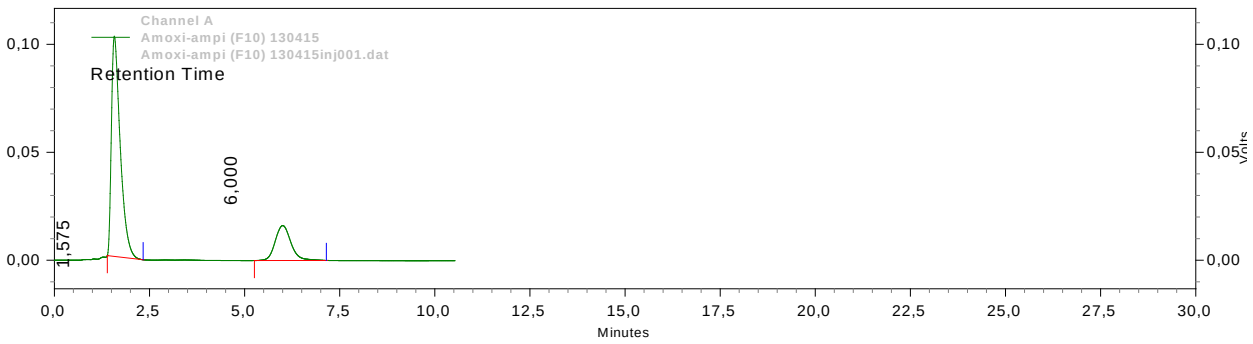
- **t = 5 min**



Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,625	1648784	79,075	101456	86,847
2	6,392	436306	20,925	15365	13,153
Totals		2085090	100,000	116821	100,000

- **t = 10 min**

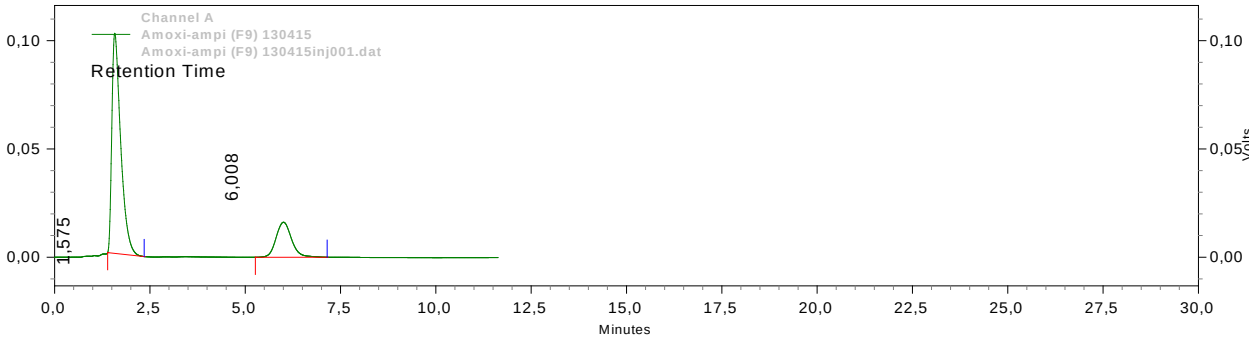


Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,575	1643700	77,978	101923	86,309
2	6,000	464209	22,022	16168	13,691

Totals		2107909	100,000	118091	100,000

- **t = 15 min**

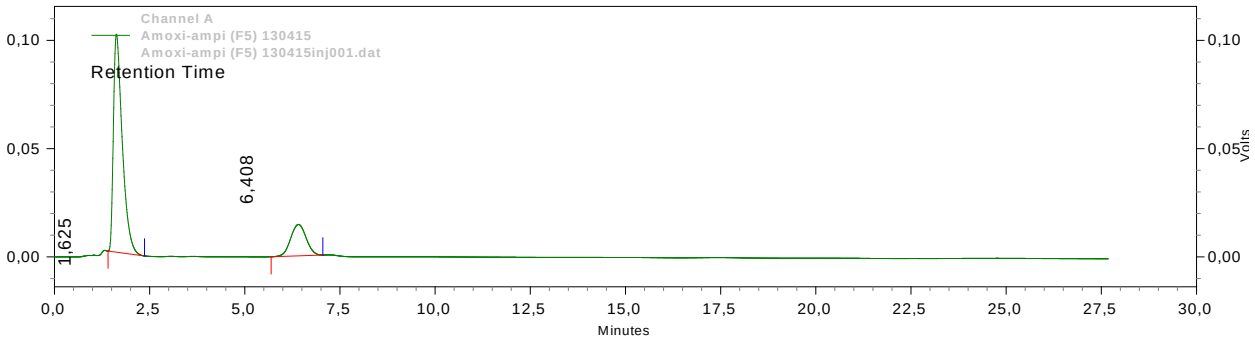


Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,575	1641098	78,129	101569	86,266
2	6,008	459401	21,871	16170	13,734

Totals		2100499	100,000	117739	100,000

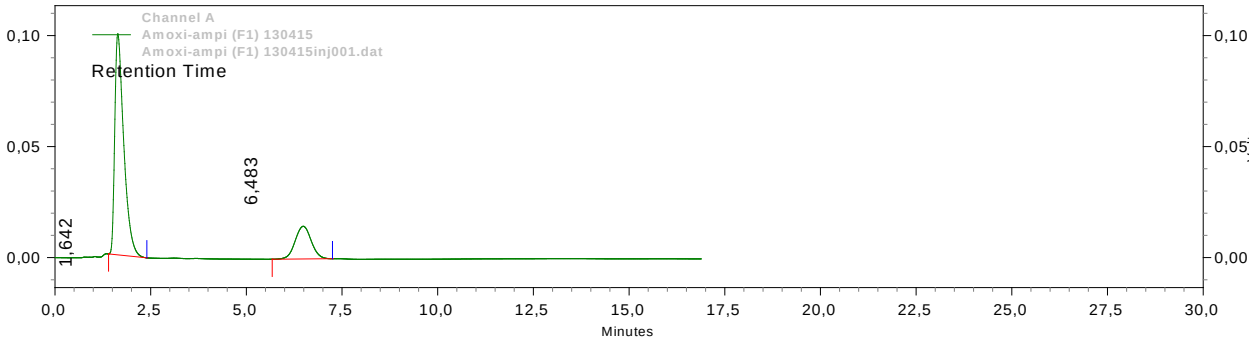
- **t = 20 min**



Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,625	1633320	79,931	100580	87,409
2	6,408	410100	20,069	14488	12,591
Totals		2043420	100,000	115068	100,000

- **t = 25 min**

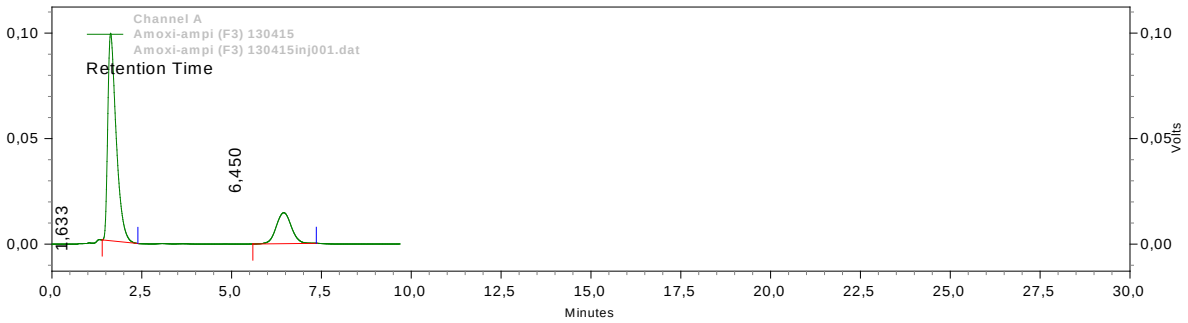


Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,642	1625722	79,079	99575	87,128
2	6,483	430097	20,921	14711	12,872

Totals		2055819	100,000		114286	100,000

- **t = 30 min**



Detector A (230nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	1,633	1601028	78,835	98274	87,007
2	6,450	429819	21,165	14676	12,993

Totals		2030847	100,000	112950	100,000