République **A**lgérienne **D**émocratique et **P**opulaire

Ministère de L'enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

Université YAHIA Farés de Médéa

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et

Environnement

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : procédés pharmaceutique

Thème :

Dépollution d'un rejet industriel par des souches bactériennes thermophiles isolées localement

Dirigé par :

- Dr. Ferhat Samira

Réalisé par :

- Aouina Chourouk hadjer
- Rabahi Soumia

Promotion 2016 / 2017


بسم الله الرحمن الرحيم

remerciements

En premier lieu, on tient à remercier le Tout- Puissant ***ALLAH*** *de nous montrer la voie, de nous donner la force, le courage et de nous avoir gardé en bonne santé a fin de mener à bien ce projet de fin d'étude.*



Notre promotrice ***Dr. FERHAT Samira***
Merci, merci infiniment pour ses précieux conseils, ses encouragements, sa disponibilité, ses orientations le long de notre travail.

Nos vifs remerciements à tous les membres de jury qui nous ont fait l'honneur et le plaisir d'accepter de juger notre travail.

On tient également à remercier tous les enseignants du département de génie des procédés pharmaceutiques et environnement surtout ***Dr .HADIDI****.*

Un grand merci aux ingénieurs de ***Hall technologique*** *de l'Université Yahia Fares de MÉDÉA et à mademoiselle* ***Nadia*** *au niveau du* ***L'ONA et*** *l'équipe de l'entreprise Galaxo Smith Kline* ***(gsk).***

Un grand merci aussi à toutes les personnes qui nous ont encouragés, soutenues et qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail surtout à nos amis qui nous avons partagés des bons moments durant nos études.

Merci a tous et a toutes.

Dédicace

Je remercie **ALLAH** *qui m'a donné la foi et la volonté d'étudier et m'a orienté dans le droit sentier.*

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut…
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance…
Aussi, c'est tout simplement que

Je dédie ce travail…

A *la plus belle créature que Dieu a créée sur terre, a cette source de tendresse, de patience et de générosité,*
A **ma mère.**
En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime.

A *la mémoire de* **mon père,** *J'aurais tant aimé que vous soyez présents…Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde*

A *mon cher frère* **oussama el montasser billah ,** *je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu le tout puissant, vous protège et vous garde.*

A *mon adorable oncle* **Djamel.**

A *mes chère et adorable* **Meriem.M et Meriem.B**

A *toutes mes amis surtout mon binôme qui j'ai partage avec elle les bons et les mauvais moments.*

*…**A** tous ceux qui me sont chers*
chourouk

Dédicace

Je dédie ce travail à …

A mes parents,

Pour m'avoir soutenue tout au long de mes études.

Pour m'avoir permise d'être qui je suis.

A mes sœurs,

Pour tous les bons moments passés ensemble.

Pour avoir été toujours présentes à mes cotés quand j'en avais besoin.

A mes frères,

Qu'ils trouvent dans ce modeste travail la preuve de mon amour et ma gratitude éternelle.

.

A ma grande famille, grande et petite.surtout Ilham

A mes chères copines :

Fatima , Djamila , rabea

A Amine qui m'a encouragé, de leur soutien durant les moments difficiles

Amon binôme qui j'ai passe avec les bons et mauvais moments.

A notre promotrice DR FERHAT Samira.

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

Soumia

Résumé

ملخص

الهدف من هذه الدراسة التحقق من عمل السلالات البكتيرية المعزولة من التربة الملوثة بالمواد الهيدروكربونية ، و إنتاج السطحي و تطبيقاته ف معالجة النفايات, أظهرت النتائج لنا أن السطحي الحيوي يتكون من عدة عناصر ، وأعطى نشاط ايجابي لميكروبات معينة في السلالات المسببة للأمراض ،و كذلك التأكد من فعالية السطحي الحيوي و السلالات المعزولة في معالجة مياه الملوثة.

الكلمات المفتاحية: السطحي الحيوي، سلالات بكتيرية أليفة الحرارة، المياه الملوثة.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier le pouvoir de deux souches bactériennes thermophiles isolées d'un sol contaminé par les hydrocarbures, à produire des tensioactifs et leurs applications dans le traitement des rejets. Les résultats obtenus nous ont montrés qu'un biosurfactant est constitué de plusieurs composants et a donnée une activité antimicrobienne positive pour certaines souches pathogènes, ainsi que la confirmation de l'efficacité des deux biosurfactants produits et les souches dans le traitement des eaux usées industrielles.

Mots clés : Biosurfactant, souches bactériennes thermophiles, l'eau usée.

Summary

The aim of this work is to study the potency of two thermophilic bacterial strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil, to produce surfactants and their applications in the treatment of discharges. The results obtained showed that a biosurfactant is composed of several components and has given positive antimicrobial activity for certain pathogenic strains, as well as confirmation of the effectiveness of the two biosurfactants produced and the strains in the treatment of industrial wastewater.

Key words: Biosurfactant, thermophilic bacterial strains, wastewater.

Table des matières

Liste des abréviations…… I

Liste des nomenclatures..... II

Liste des figures…….. IV

Liste des tableaux…… V

Introduction générale……. 1

Chapitre I : Généralité sur les bactéries

I.1Introduction…… 3

I.2 composition des bactériennes…… 3

I.3 type des bactéries…… 4

I.4 La souche bactérienne thermophile…… 5

I.5 Marinobacter hydrocarbonoclasticus…… 6

I.5.1. Caractéristiques bactériennes……. 6

I.5.2. Structure génomique et phylogénie…… 6

I.5.3. Métabolisme…… 7

I .5.4. Importance ……. 7

I.6 Bacillus astrophaeus……..... 8

I.7 Notion d'écologie microbienne…….. 9

I.7.1. Définition d'un écosystème…… 9

I.7.1.1. Les interactions entre les composants de l'écosystème……... 10

I.7.2. Les méthodes classiques d'écologie microbienne…….. 10

I.7.2.1. Les cultures d'enrichissement …… 10

I.7.2.2. L'isolement……..... 10

Chapitre II : Les tensioactifs

II.1. Introduction…… 12

II.2. Historique…….. 12

II.3. Définition…… 13

II.3.1 structure……..... 13

II4. Classification des tensioactifs…….. 15

II .4.1. Classification chimique (TA synthétiques)…… ……..... 15

II .4.1.1. Tensioactifs anioniques……. 15

II.4.1.2. Tensioactifs non ioniques…… 17

II.4.1.3. Tensioactifs cationiques…… 21

II.4.1.4. Tensioactifs zwitterioniques ou amphoteres…….. 21

II.4.2. les tensioactifs naturels (biosurfactants)……. 22

II.4.2.1. Définition…… 22
II.4.2.2. Structure et classification des biosurfactants…… 22
II.4.2.3. Role des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures…… 23
II.5. Effets des tensioactifs sur une station d'épuration…….. 24
II.6. Domaines d'application des tensioactifs…… 25
II .6.1. Secteur de la détergence…….. 25
II.6.2. Secteur de la cosmétique…….. 25
II.6.3. Secteur industriel…… 26
II.7. Les différentes applications selon le type de tensioactifs……. 26
II.8. propriétés des agents tensioactifs……. 28

Chapitre III : Pollution et dépollution d'un rejet

III. La pollution des eaux…… 29
III .1. Introduction…….. 29
III.2. Les eaux usées…… 29
III.2.1. Définition……..... 29
III.2.2. Origine de la pollution des eaux……..... 30
III.2.2.1. La pollution physique……. 30
III.2.2.2. La pollution chimique…… 30
III.2.2.2.1. Les substances chimiques indésirables…….. 31
III.2.2.2.2. Les nitrates et autres composés azotés……..... 31
III.2.2.2.3. la pollution phosphatée…….. 32
III.2.2.2.4. Les pesticides…… 33
III.2.2.2.5. Les détergents……..... 33
III.2.2.2.6. Les produits chimiques toxiques……. 34
III.2.2.3 imputé de nature biologique…… 35
III 2.2..3 .1 Les Bactérie……. 35
III 2.2.3.2 Les Virus…… 35
III.2.2.3.3 Les protozoaires……... 36
III.2.2.3.4 Les helminthes……. 36
III.2.2.4La pollution organique…….. 37
III.3 Caractérisation des eaux useés……. 37
III.3.1Les paramètre -physico chimique…… 37
III.3.1.1 La température…… 37
III.3.1.2 Le potentiel hydrogène…….. 37

III.1.3 la matière en suspension…… 38
III.3.1.4 la conductivité électrique……..... 38
III .3.1.5 la demande biochimique (DBO_5)…… …… 39
III.3.1.6 la demande chimique en oxygène……..... 39
III.4 le principe l'épuration biologique…… 39
III.5 les procède des traitements des eaux usée……. 40

CHAPITRE IV : Matériels et méthode

IV.1.Introduction ……..... 42
Partie A …… 42
IV2.Production et caractérisation du biosurfactant …… 42
IV2.1. Matériel et produits utilisés……..... 42
IV 2.1.1. Matériel utilisés …….. ……. 42
IV 2.2.2. Produits utilisés …… ……. 42
IV2.2. La méthode de production…….. . 43
IV 2.2.1. Préparation de l'inoculum…….. 43
IV 2.2.2. milieu de production …….. 44
IV 2.3. la caractérisation des biosurfactants …… ……. 46
IV2.3.1. Spectrophotométrie infrarouge IR ……. 46
IV 2.3.2. La chromatographie liquide à haute performance(HPLC)…… ……. 47
IV 2.3.3 l'activité antimicrobienne…….. 48
Partie B…… 49
IV3.Méthode de la dépollution de l'eau usée pharmaceutique…… 49
IV3.1. Les eaux usées pharmaceutiques……..... 49
IV3.2. le traitement par les souches bactériennes…… 49
IV3.2.1. la production de milieu LB……..... 49
IV3.3. traitement par les biosurfactant…… 51
IV4.les méthodes d'analysesl…… 51
IV4.1. détermination du pH……. 51
IV4.1.1. principe…….. 51
IV4.1.2. appareillage…….. 51
IV4.1.3 Echantillonnage…… 51
IV4.1.4. Mesurage des échantillons……. 51
IV4.2. La conductivité……. 52
IV 4.3. Dosage des matières en suspensions MES……. 53
IV4.3.1. principe…… 53

IV4.3.2 Appareillage…… 53
IV4.3.3 calcul…… 54
IV4.4. la demande chimique en oxygène DCO…….. 54
IV4.4.1 principe…… 54
IV4.4.2 Expression des résultats……..... 56
IV4.5. spectrophotométrie UV-Visible…….. 56
IV 4.5.1 principe…… 56

Chapitre V : discussion et résultat

V.1.Production de biosurfactant……... 58
V.1.1Extraction de biosurfactant ……. 58
V.1.2.caractérisation des biosurfactants……. 59
V.1.2.1 Spectre infrarouge…….. 59
V.2. dépollution d'un rejet……..... 64
V.2.1. caractérisation d'eaux usées pharmaceutique……. 64
V.2.1.1 Détermination des paramètres physico chimique de rejet avant la dépollution. 64
V.2.1.2 traitement d'épuration par la souche……..... 65
V.2.1.2.1 La souche marinobacterhydrocarbonoclasticus……. 65
V.2.1.2.2 la souche Bacillus atrophaeus…… 66
V.2.1.3 traitement d'épuration par Biosurfactant …… 68
V.2.1.3.1 Biosurfactant A…….. 68
V.2.1.3.2. Biosurfactant B……. 69
Conclusion générale…….. 71
Annexe…… 72
Référence…… 76

liste des abréviations

Abréviation	Signification
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AES	alcohol ether sulfates
APG	alkylpolyglycosides
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
B	Les Gammaproteobacteria
CAB	Basque pure souche
CE	conductivité électrique
CMC	Concentration Micellaire Critique
DBO5	demande biochimique en oxygène
DCO	demande chimique en oxygène
Do	absorbance
FAGA	fatty acid glucamide
FAS	fatty acid sulfate
HLB	Balance Hydrophile Lipophile
HPLC	la chromatographie liquide à haute performance
IR	infrarouge
LAS	alkylbenzènesulfonates linéaires
LB	Luria-Bertani
M	Manuel Bergey de bactériologie systématique
MES	matières en suspension
MMS	matières minérales
MO	matière organique
MVS	matières volatiles en suspension
PHA	polyhydroxyamides
pH	potentiel d'Hydrogène
POA	Poly Oxy Alkylene
PVC	Polychlorure de vinyle
TA	Tensioactif
UV	rayonnement ultraviole

Nomenclatures

Symbole	Désignation	Unité
C	Concentration	(g/l)
min	temps	minute
V	Volume	(ml)
tr/min	Tour par minute	
Mg	Milligramme	
%	pourcentage	
C°	Degré Celsius	°
ρ	La teneur en matières en suspension	
n	composition	
M	La masse	(g)
j	jour	
V/h	Volume par heure	(M^3/h)

liste des figures

Figure	Titre de figure	Page
Chapitre I		
Figure I.1	Schéma de la structure cellulaire d'une cellule bactérienne.	4
Chapitre II		
Figure II.1	Représentation schématique d'un tensioactif	14
Figure II .2	Les différents types de tensioactifs	14
Figure II.3	Tensioactif anionique : Dodécyl benzène sulfonate de sodium	15
Figure II.4	Tensioactif nonionique : Octyl phenol poly-éthoxylé	18
Figure II.5	Tensioactif cationique Chlorure de n-dodécyl pyridine	21
Figure II.6	Tensioactif amphotère : Alkyl bétaine	21
Figure II.7	Observation sous microscope électronique du réseau formé par la souche Pseudomonas sp. SSC2 cultivé sur 2% de n-hexadecane	24
Figure II.8	Observation sous microscope électronique à transmission de gouttelettes d'héxadecane englouties par la souche Pseudomonas sp. SSC2, Morgagni TEM	24
Chapitre IV		
Figure IV.1	la souche bactérienne (A)	43
Figure IV.2	la souche bactrienne(B)	43
Figue IV .3	la préculture de la souche A et B	44
Figure IV.4	la solution oligelement préparé	44
Figure IV .5	préparation milieu de culture	44
Figure IV.6	l'incubation de milieu de production	45
Figure IV.7	extraction de biosurfactant par l'acétone	45
Figure IV.8	les équipements d'infra rouge IR	46
Figure IV.9	Principe de fonctionnement d'une chaine HPLC	47
Figure IV.10	les équipements de HPLC	48
Figure IV.11	La station des eaux usées pharmaceutiques	49
Figure IV.12	le milieu LB (originale)	50
Figure IV.13	Représentation de l'incubateur shaker	51
Figure IV.14	le pH mètre original	52
Figure IV 15	le conductivimètre	53
Figure IV.16	représentation d'équipement matière en suspension (originale)	54
Figure IV.17	le montage de DCO	55

Figure IV.18	le spectrophotomètre (originale)	57
Chapitre V		
Figure V.1	La poudre de biosurfactant A (originale)	58
Figure V.2	La poudre de biosurfactant B (originale)	59
Figure V.3	Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche *marinobacter hydrocarbonoclasticus*	59
Figure V .4	Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche *Bacillus Atrophaeus*	60
Figure V.5	l'activité antimicrobienne des produits A et B sur *Escherichia coli*	62
Figure V.6	Activité antimicrobienne des produits A et B sur *Staphylococcus aureus*	62
Figure V.7	HPLC Chromatogram de biosurfactant A	63
Figure V.8	la variation de l'absorbance (rejet +souche A) en fonction du jour	65
Figure V.9	la variation de la DCO (rejet +souche A) en fonction de jour	66
Figure V.10	la variation de l'absorbance (rejet +souche A) en fonction de jour	66
Figure V.11	la variation de la DCO du (rejet +souche B) en fonction de jour	67
Figure V.12	la variation l'absorbance du (rejet +biosurfactant A).	68
FigureV.13	la variation de la DCO du (rejet +biosurfactant A) en fonction de jour	68
Figure V.14	la variation d'absorbance du (rejet +biosurfactant B) en fonction du temps	69
Figure V.15	la variation de la DCO (rejet +biosurfactant B) en fonction de jour.	70

liste des tableaux

Tableau	Titre du tableau	page
Chapitre I		
Tableau I.1	Caractéristiques des procaryotes et eucaryotes	5
Chapitre II		
Tableau II.1	Source microbienne et principaux types de biosurfactants	23
Tableau II.2	Exemples d'applications des tensioactifs dans le secteur industriel	26
Tableaux 3	regroupent les 4 grandes familles de tensioactifs que l'on peut rencontrer, leur nature chimique ainsi que leurs principales applications industrielles	27
Chapitre V		
Tableau V.1	Groupements caractéristiques du biosurfactant A	60
Tableau V.2	Groupements caractéristiques du biosurfactant B	61
Tableau V.3	valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) de différents produits synthétisés sur la croissance d'Escherichia *coli* et *Staphylococcus aureus*	62
Tableau V.4	Déterminations des paramètres physico chimiques	64
Tableau V.5	La détermination de MES	64
Tableau V.6	La détermination de DCO avant la dépollution	64
Tableau V.7	la variation d'absorbance (rejet +souche A) pendant 5 jours.	65
Tableau V.8	la variation de la DCO (rejet +souche A) pendans les 5 jours.	65
Tableau V.9	la variation d'absorbance de (rejet +souche B) pendant 5jours.	66
Tableau V.10	la variation de la DCO du (rejet+souche B) pendant les 5 jours.	67
Tableau V.11	la variation d'absorbance du (rejet +biosurfactant A).	67
Tableau V.12	la variation d' du (rejet +biosurfactant A) pendant 5jours.	68

Tableau V.13	la variation d’absorbance du (rejet +biosurfactant) pendant 5jours	69
Tableau V.14	la variation de DCO du (rejet +biosurfactant) pendant 5jours.	69

Introduction



Introduction général

Chaque fois que nous entendons le mot bactérie, nous supposons que quelque chose est sale, que notre alimentation est mauvaise, mais ce n'est pas toujours vrai, Il y a beaucoup de types de mauvaises bactéries qui peuvent nous nuire en se glissant dans notre eau ou notre alimentation, mais il y a beaucoup de bonnes bactéries qui nous aident chaque jour.

Les tensioactifs sont des composés chimiques comporte un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe.
Ils sont classés à des tensioactifs synthétiques qui sont anioniques, non ioniques, cationiques et amphotères, et des tensioactifs naturels.
On peut les utilisés dans plusieurs domaines tels que les détergents, les cosmétiques et également dans le secteur industriel comme le cuir, la peintures et les matières plastiques.

Le biosurfactant est un tensioactif naturelle, constituent des outils très intéressants dans beaucoup d'applications industrielles et environnementales, et peuvent être envisagés comme remplaçants au surfactants chimiques vu leur biodégradabilité, biocompatibilité et manque de toxicité.

Dans le cadre de ce travail, nous, nous proposons une étude sur la caractérisation et l'évaluation d'un rejet pharmaceutique après le traitement par les souches bactériennes et les biosurfactants.

Ce travail comporte deux parties principales :

La partie bibliographique est composée essentiellement de trois chapitres :

- Le premier chapitre présenté les souches bactérienne thermophiles, leurs types et leurs composition.
- Le deuxième chapitre présenté les différentes applications de tensioactifs et leurs classifications.
- Le troisième chapitre traite des paramètres des traitements biologiques des eaux usées pharmaceutiques.

La partie expérimentale qui est composée de deux chapitres :

-Le premier chapitre sur l'objectif général du travail expérimental ainsi que sur le matériel et les méthodes d'analyse.

-Le deuxième chapitre sur la caractérisation physicochimique d'un rejet pharmaceutique avant et après l'épuration.

Enfin, nous terminons notre étude par une conclusion générale où sont récapitulés les principaux résultats obtenus.

Chapitre I :
Généralité sur les bactéries



I.1 Introduction

La bactérie est un organisme unicellulaire , sa taille est de quelques micromètres de diamètre. Les bactéries sont indispensables à la vie sur Terre et elles se comptent par milliards dans tous les écosystèmes de tous les biomes. La bactériologie étudie les bactéries, y compris dans l'eau du robinet pour en vérifier sa potabilité.

La bactérie, une cellule bactérienne du domaine Bacteria, nomme en terme général les microbes unicellulaires de forme allongée (bacilles) ou sphériques (coques)[1]. Les bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes rencontrés sur Terre. Elles peuvent être isolées du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques, des déchets radioactifs [2], de la croûte terrestre, sur la peau et dans l'intestin des animaux. Les bactéries ont une importance considérable dans les cycles biogéochimiques comme le cycle du carbone et la fixation de l'azote de l'atmosphère.

Les bactéries peuvent être très utiles à l'humain lors des processus de traitement des eaux usées, dans l'agroalimentaire lors de la fabrication des yaourts ou du fromage et dans la production industrielle de nombreux composés chimiques [3].

I.2 Composition bactérienne

Certains éléments se retrouvent sur toutes les bactéries, on dit que ce sont des éléments obligatoires. D'autres ne se retrouvent que sur certaines bactéries, ce sont les éléments facultatifs.

Les ribosomes : ils servent à fabriquer des protéines.
Le chromosome : c'est l'ADN de la bactérie. L'ADN ou information génétique constitue l'ensemble des informations nécessaires au bon fonctionnement de la cellule (ici de la bactérie).
Les granulations de réserves : elles stockent des éléments nutritifs.
La membrane plasmique : elle donne un contour à la bactérie, C'est son enveloppe.
La paroi : elle recouvre la membrane plasmique et donne une forme à la bactérie.
Les plasmides : ce sont des petits morceaux d'ADN, la bactérie peut s'adapter à différents milieux dans lesquels elle ne pourrait pas survivre en temps normal.

Les pili: il en existe de deux sortes : les pili communs, qui permettent de fixer la bactérie sur un support, et les pili sexuels qui servent à faire passer des plasmides d'une bactérie à un autre.

Les flagelles : ils forment une sorte de queue. La bactérie peut alors se déplacer facilement.

La capsule : elle recouvre la paroi et forme une protection supplémentaire pour la bactérie. Il est plus difficile de se débarrasser d'une bactérie qui possède une capsule [4].

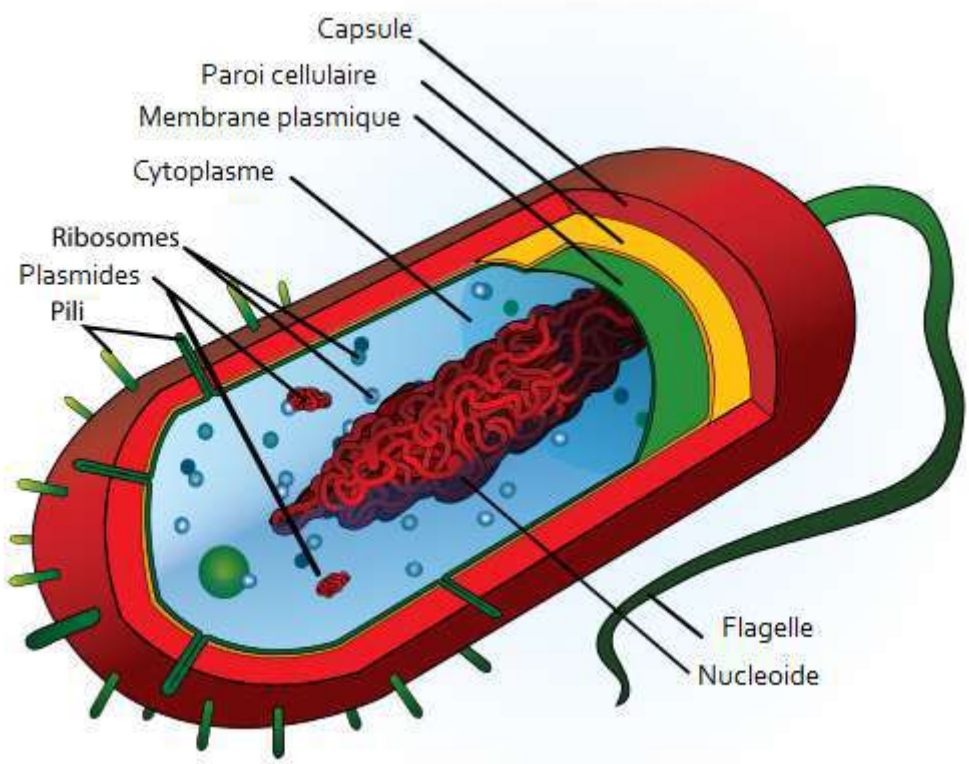


Figure I.1 Schéma de la structure cellulaire d'une cellule bactérienne [4].

I.3 Types des bactéries

Les bactéries qui respirent utilisent l'oxygène pour produire de l'énergie, elles sont aérobies. D'autres utilisent un autre phénomène, la fermentation, pour produire leur énergie : elles sont anaérobies.

Il existe aussi des types intermédiaires :
les microaérophiles qui n'ont besoin que d'un petit peu d'oxygène pour vivre, et les aéro-anaérobies facultatives, qui peuvent aussi bien vivre avec ou sans oxygène [4].

Tableau I.1 Caractéristiques des procaryotes et eucaryotes [5]

Caractéristiques	Procaryote	Eucaryote
Taille habituelle	0.3 à 2.5 µM	2 à 20 µM
Noyau avec membrane (m)	-	+ (mn)
Nombre de chromosomes	1	>1
Réplication par milose	-	+
Position de l'ADN	Nucléoide ou plasmides	Noyau et certains organites intracellulaires
Présence d'organites intracellulaires	Aucun	Habituellement présents (mitochondries, m, appareil de Golgie, G)
Membranes contenant des stérols	Aucune	Souvent présentes
Enveloppes cellulaires	Hétéropolymère	Cellulose et autres polysaccharides, seulement dans les plantes
Flagelles et cils	Pas de cils	Agencement typique

I.4 La souche bactérienne thermophile

Les microorganismes thermophiles ont eu de grand intérêt scientifique principalement en ce qui concerne leur potentiel biotechnologique et aussi les enzymes thermostables qu'ils produisent telles que les amylases et les protéases, a cause de leurs nombreuses propriétés intéressantes, ces enzymes sont de plus en plus utilisées dans le monde industriel [6].

I.5 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

I.5.1 Caractéristiques bactériennes

Marinobacter hydrocarbonoclasticus a d'abord été isolé près d'une raffinerie de pétrole en Méditerranée. Il s'agit d'une bactérie marine gram-négative, en forme de bâtonnets, et n'est pas capable de sporuler. En moyenne, ils sont entre 0,3-0,6 µm de diamètre et 2-3 µm de long [7]. Les cellules ont un flagellon polaire non bouché leur permettant d'être mobiles dans l'environnement marin. Ils sont également extrêmement halotolerance et quelque peu halophilic [8]. Ils peuvent pousser dans un environnement avec une concentration de NaCl de 0,08 M - 3,5 M, avec une concentration optimale de NaCl de 0,6 M .Les bactéries se développent habituellement et vivent dans un environnement à une température de 10 - 45 ° C et une PH de 6 à 9,5. La teneur en NaCl est importante pour

M. hydrocarbonoclasticus, car la concentration en NaCl à la capacité d'affecter la forme et la flagellation de ces cellules. L'espèce est capable de dégrader différents types d'hydrocarbures et de les utiliser comme source unique de carbone et d'énergie. Dans l'ensemble, *M. hydrocarbonoclasticus* a la capacité d'habiter et de grandir dans un large éventail d'environnements dans l'écosystème marin [7].

I.5.2 Structure génomique et phylogénique

Marinobacter hydrocarbonoclasticus a une taille totale du génome d'environ 4 Mb avec une teneur en G + C de 57,4% [7]. La taille globale du génome de la bactérie varie de 4,3 - 4,9 Mb, qui sont plus petit que les autres génomes *Marinobacter* tels que *Marinobacter adhaerens* [9]. Le génome est composé de 3807 régions de codage de protéine (~ 91% du génome) [10]. *M. hydrocarbonoclasticus* a la capacité de former des biofilms, qui exige trois groupes de gènes de biosynthèse de polysaccharide, quatre grappes de gènes de pilus, et plusieurs gènes de ménage (genoux) [7].

De plus, une analyse de la séquence d'ARNr 16S indique que *M. hydrocarbonoclasticus* appartient aux protéobactéries de type gamma et est distinctif de bactéries ayant des propriétés morphologiques et biochimiques similaires. L'espèce est étroitement liée à *Marinobacter sp*. Souche CAB et *Marinobacter aquaeolei*, dans lesquelles l'analyse de l'ARNr 16S indique que *M. hydrocarbonoclasticus* est 99,8% semblable à *Marinobacter sp*. Souche CAB et est

99,4% semblable à *Marinobacter aquaeolei* .Cela démontre qu'il existe d'autres espèces de *Marinobacter* qui sont extrêmement semblables à *M. hydrocarbonoclasticus* sur un niveau d'ADN [11].

I.5.3 Métabolisme

Marinobacter hydrocarbonoclasticus présente des activités catalase, oxydase, tweenase et lécithinase, qui permettent à la bactérie de dégrader les substances hydrophobes dans un environnement aérobie [7]. La cellule est capable de dégrader les alcanes cycliques et non cycliques. Comme les hydrocarbures pétroliers sont souvent des alcanes non cycliques, l'espèce est capable de se dégrader et de les utiliser à la fois comme sources de carbone et d'énergie. Par exemple, elle a des activités hydrocarbonées importantes sur des chaînes d'hydrocarbures telles que l'hexadécane ($C_{16}H_{34}$), l'eicosane ($C_{20}H_{42}$), le pristane ($C_{19}H_{40}$), et d'autres pour des utilisations d'énergie et de carbone [12]. Par conséquent, *M. hydrocarbonoclasticus* est un agent potentiel pour la bioremédiation. Il est important de souligner que la bactérie ne contient pas de cytochrome P450, qui est une hydroxylase terminale qui est importante pour la décomposition des cycles aromatiques stables dans de nombreux hydrocarbures pétroliers [13]. Cependant, l'espèce a la capacité de décomposer anaérobie et composés aromatiques, ce qui rend l'organisme unique de nombreux autres dégradants d'hydrocarbures.

En outre, les bactéries *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ne sont pas limitées aux hydrocarbures pour les sources d'énergie et de carbone. Les cellules peuvent utiliser nitrate (NO_3^-) ou nitrite (NO_2^-) comme accepteur d'électrons terminal pour former un produit gazeux tel que N_2O, en consommant d'autres substances organiques telles que le citrate, l'acétate ou le succincte comme sources de carbone et d'énergie. Par conséquent, ils sont considérés comme des dénitrifier qui pourraient également croître dans un environnement anaérobie [7].

I.5.4 Importance

Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants potentiels qui pourraient causer de graves dommages aux écosystèmes marins composés principalement des chaînes d'alcane non cycliques, sont hydrophobes et récalcitrants par nature, ce qui les rend extrêmement difficiles à éliminer. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, avec d'autres

espèces de *Marinobacter,* joue un rôle important dans bioremediation. Les bactéries M. *hydrocarbonoclasticus* sont spécialisées dans les hydrocarbures dégradants, en particulier les n-alcanes. Cette capacité distinctive permet aux cellules d'être un organisme idéal pour traiter les polluants récalcitrants.

Marinobacter hydrocarbonoclasticus peut également aider à l'avancement technologique de la bioremédiation en servant de modèle idéal pour étudier la biodégradation des hydrocarbures, car il se développe bien en laboratoire et est bio-dégradants spécialisés. Par exemple, Hamdan et Fuller (2011) ont utilisé un dispersant chimique, COREXIT® EC9500A, pour étudier son effet sur les bactéries. Ils ont découvert que le produit chimique inhibait le bon fonctionnement des bactéries dégradant les hydrocarbures et pourrait diminuer la capacité de bioremédiation [14]. Ainsi, la recherche de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* aide dans le développement de bioremediation en fournissant aux scientifiques plus de connaissance au sujet des bactéries dégradant des hydrocarbures.

I.6 *Bacillus atrophaeus*

Bacillus atrophaeus est une bactérie Gram-positive, aérobie, formant endospore, dont la description est pratiquement identique à celle de *Bacillus subtilis* sauf pour la production d'un pigment sur un milieu contenant une source d'azote organique [15].

Bacillus atrophaeus est une espèce de bactéries pigmentées noires. Sa souche type est NRRL NRS-213 [15], Les souches *B. atrophaeus* ont été largement utilisées dans la biomédecine comme souches indicatrices pour les schémas de décontamination chimique et thermique. La plupart des souches en usage sont des dérivés d'une lignée de *B. atrophaeus* qui sont nés à Camp Detrick dans les années 1950, où de nombreuses procédures modernes de bioconfinement ont été développées [16] - [18].

B. atrophaeus a été historiquement connu par plusieurs autres noms, y compris *B. globigii* (l'origine de son surnom militaire "BG") et B. subtilis var-Niger. Des analyses phylogénétiques modernes utilisant des méthodes génétiques multiples ont placé *B. atrophaeus* près de *B. subtilis* [17] - [20], Son utilisation originale et encore la plus importante est en tant qu'organisme de substitution pour *B. anthracis* pathogène [20], En commençant par le programme d'armes biologiques des États-

Unis, car sa pigmentation facilitait facilement la discrimination d'organismes de base non pigmentés dans des échantillons environnementaux.
Des analyses génomiques et phénotypiques ultérieures de souches issues des isolats de Camp Detrick ont révélé qu'elles avaient été délibérément sélectionnées pour des souches présentant des taux élevés de sporulation [17] - [21].

I.7 Notions d'écologie microbienne

L'écologie microbienne est une discipline située au carrefour de deux grands champs de recherche: l'écologie et la microbiologie, elle a pour objectif d'étendre la compréhension des relations entre la biodiversité des microorganismes, l'activité microbienne, et les facteurs écologiques du milieu, de l'échelle individuelle à celle des communautés microbiennes. Il s'agit donc d'une modélisation des écosystèmes (eau, air, sol) ou les microorganismes sont des acteurs majeurs du fonctionnement.

Face aux demandes sociétales vis-à-vis des changements globaux, du développement durable, de l'extension industrielle, de la préservation de la santé humaine et animale, et de la biodiversité et ressources naturelles, cette discipline est actuellement en plein essor, se devant d'apporter des réponses aux perturbations anthropiques de l'environnement [22].

Ces dernières années, les études relevant, à des degrés divers, du concept de biodiversité se sont multipliées. Les analyses de diversité microbienne, sensu inventaire des espèces et sous-espèces d'un environnement, se sont notamment considérablement développées. En effet, l'étude des microorganismes habitant les environnements naturels avait longtemps consisté en une approche culturale puis une caractérisation des isolats purs selon des critères définis par la taxonomie [23]. Toutefois, les techniques d'analyse restent en évolution permanente pour établir une classification stable et pallier les déficiences des voies classiques [22].

I.7.1 Définitions d'un écosystème

Un écosystème est un ensemble dynamique au sein du quel interagissent à divers degrés des facteurs biotiques (individu, population, communauté…) et abiotique (facteurs physico-chimiques) [24].

I.7.1.1 Les interactions entre les composants de l'écosystème

La nature d'une communauté microbienne est soumise à des fluctuations temporelles et spatiales qui correspondent à des phases de colonisation de nouveaux milieux ou de remplacement d'une communauté par une autre plus adaptée.

Nous savons qu'un grand nombre de facteurs peut modifier la composition de la communauté microbienne : la disponibilité en sources de carbone, d'énergie et en accepteurs d'électrons, la température, le pH, la teneur en eau ou encore la lumière, Pour survivre et se propager, les microorganismes ont développé des adaptations structurales et nutritionnelles correspondant à différentes stratégies qui restent fonction des conditions physico-chimiques aux quelles ils sont exposés.

Aux facteurs extérieurs s'ajoutent les fortes interactions qui peuvent se produire au sein d'une population (coopération ou compétition) ou entre populations (synergie, symbiose et antagonisme) [22].

I.7.2 Les méthodes classiques d'écologie microbienne

I.7.2.1 Les cultures d'enrichissement

La plupart de nos connaissances sur les microorganismes proviennent d'études réalisées sur des cultures pures isolées de l'environnement. Cet isolement est précédé par une phase d'enrichissement qui va favoriser la croissance d'un type donné de microorganismes, sélectionné en fonction des conditions physiques et nutritionnelles du milieu [22].

I.7.2.2 L'isolement

A partir de l'enrichissement il est possible d'isoler des espèces pures. Pour ce faire on dispose de techniques classiques qui sont : l'isolement sur boite, la dilution successive en milieu liquide ou dans l'agar. Pour chacune des méthodes plusieurs repiquages successifs des souches isolées sont nécessaires pour s'assurer de la pureté de l'isolat [22].

Une fois la souche isolée il convient de la caractériser, c'est-à-dire de définir les caractères phénotypiques et génotypiques qui permettront de la comparer avec d'autres microorganismes préalablement isolés. On réalise alors une taxonomie [22].

Chapitre II :
Les tensioactifs



II.1. Introduction :

Les tensioactifs sont des molécules d'intérêt dont le squelette amphiphile laisse apparaître des propriétés de surface spécifiques. Cette particularité structurale autorise leur usage pour la formulation de produits de consommation courante [25].

Les tensio-actifs sont largement utilisés dans la vie quotidienne par le biais des détergents commerciaux et des produits cosmétiques. Ils ont aussi de nombreuses applications industrielles [26], peuvent être utilisés comme agent de solubilisation, agent moussant, agent mouillant (ils permettent un meilleur étalement d'un liquide sur un solide), agent dispersant (évite la floculation de particules hydrophobes), agent émulsifiant (facilite l'émulsion entre deux liquides non miscibles) ou antiseptiques (agent bactéricide) [27].

Compte-tenu des importants volumes produits chaque année et du développement des comportements respectueux de l'environnement, les tensioactifs doivent répondre de plus en plus à des impératifs de biodégradabilité. À ce titre, l'emploi de ressources naturelles comme matière première de base propose une alternative de choix pour la synthèse de nouveaux composés respectueux de l'environnement [25].

II.2. Historique :

Parmi tous les tensioactifs que nous connaissons aujourd'hui, le plus ancien est le savon. Les premiers utilisateurs de savon auraient été les Sumériens en 2500 av. J.C. Ils fabriquaient les pains de savon à partir d'huiles végétales ou animales, de cendre d'os ou de bois et d'extraits de plantes parfumées. Les tensioactifs, tels que nous les connaissons aujourd'hui, sont donc relativement récents. Les tensioactifs sont utilisés dans la plupart des actes de la vie courante. L'application la plus connue est la détergence [28].

En 2001, l'Europe consommait 50% de sa production en tensioactifs pour des formulations de nettoyage ou de lavage. Mais leurs applications aujourd'hui ne se limitent pas à ceux-ci. On les retrouve dans de nombreux secteurs. Ainsi, la cosmétologie et l'hygiène corporelle représentent 10% de la production de tensioactifs. Par ailleurs, 40% des besoins sont liés au développement de secteurs industriels aussi variés que l'industrie textile, le forage et le raffinage du pétrole, les

industries métallurgiques et minières, l'émulsification des bitumes, etc. (Noiret and al. 2002) [29]. Des applications aussi diverses nécessitent une grande variété d'agents de surface. La nature et la structure des tensioactifs sont donc modulées en fonction de l'application visée [28].

Le volume mondial de production de tensioactifs était en 2001 de 11 millions de tonnes 1b, dont 2,4 millions en Europe. Les tensioactifs anioniques représentent 55% de la production mondiale annuelle, répartis à 33% de carboxylates (savons) et 22% de sulfonates et sulfates [30].

Les composés cationiques et zwitterioniques sont beaucoup moins représentés puisqu'ils ne couvrent respectivement que 6% et 1% du marché mondial, loin derrière les anioniques. Les tensioactifs non ioniques prennent chaque jour plus d'importance pour représenter aujourd'hui 38% de la production mondiale annuelle [25].

II.3. Définition :

Les tensioactifs désignent toutes les substances qui permettent de modifier la tension entre deux surfaces. Ils sont utilisés comme détergents, agents moussants, agents dispersants, agents mouillants, agents émulsifiants ou agents de solubilisation [30].

Les tensioactifs communément appelés détergents par les biologistes sont des composés amphiphiles comportant des domaines polaires et apolaires bien distincts présentant une solubilité marquée dans l'eau. Les tensioactifs ou « surfactants » en terme anglo-saxon sont des agents de surface capables de réduire la tension inter faciale de mélanges (ex, huile et eau) en s'adsorbant aux interfaces [31].

II.3.1.Structure :

Les tensio-actifs sont des composés chimiques dont la molécule comporte au moins un groupement hydrophile, qui assure la solubilité dans l'eau, et un groupement hydrophobe (Figure II .1). Leur propriété caractéristique est de se concentrer aux interfaces (liquide-liquide, liquide-solide...) et de réduire les tensions superficielles [26].

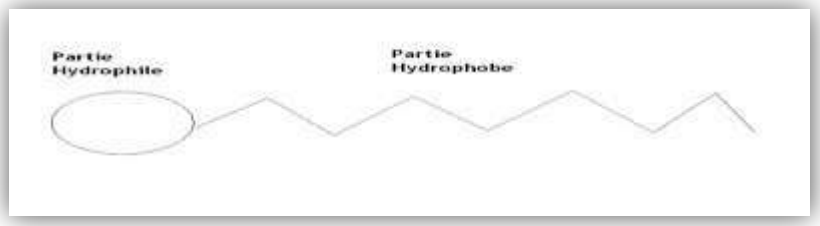


Figure II.1 : Représentation schématique d'un tensioactif [32].

Dans la littérature, on rencontre diverses structures de tensioactifs, variant notamment selon la nature de la partie hydrophile qui peut être cationique, anionique, zwitterionique ou non ionique. La partie hydrophobe, quant à elle, est le plus souvent sous forme d'une chaîne aliphatique de longueur variable, ramifiée ou non [25].

On peut diviser les tensioactifs, appelés aussi surfactants, en plusieurs catégories en fonction de leur structure (nombre et disposition des pôles hydrophiles et hydrophobes au sein de la molécule). La structure la plus courante nommée tensioactif monocaténaire est celle comportant une tête hydrophile et une chaîne hydrophobe. On rencontre des tensioactifs possédant plusieurs chaînes hydrophobes greffées sur la même tête hydrophile (tensioactifs bicaténaires et tricaténaires), mais aussi plusieurs têtes hydrophiles reliées à une ou plusieurs chaînes hydrophobes appelés tensioactifs bolaformes ou géminés (Figure II .2) [25].

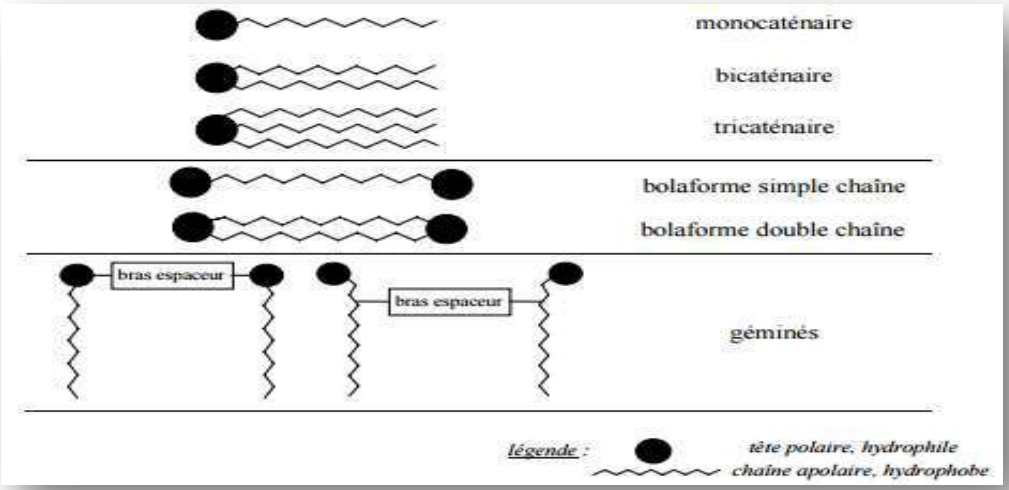


Figure II .2. Les différents types de tensioactifs [25].

Les tensioactifs à la surface d'un liquide s'organisent de telle sorte que la tête hydrophile soit au contact de l'eau et la chaîne hydrophobe orientée vers l'extérieur [25].

II .4.Classification des tensioactifs:

II .4.1 Classification chimique (TA synthétiques):

Classification De la nature de leur tête polaire, Il existe quatre grandes classes de tensioactifs.

II.4.1.1 Tensioactifs anioniques :

Les surfactants anioniques se dissocient en un anion amphiphile, et un cation qui est en général un métal alcalin ou un ammonium quaternaire [33].

A ce type appartiennent les détergents synthétiques comme les alkylbenzène sulfonates, les savons tels les sels de sodium d'acides gras, les agents moussants comme le lauryl sulfate, les humectants du type sulfosuccinate, les dispersants du type lignosulfonate, etc.

La production des surfactants anioniques représente environ 55 % des surfactants produits annuellement dans le monde [33].

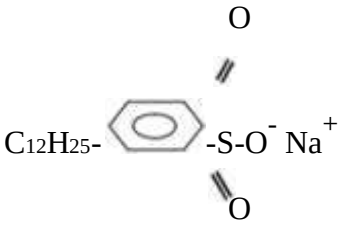


Figure II.3: Tensioactif anionique : Dodécyl benzène sulfonate de sodium [33].

Les tensioactifs anioniques présentent une faible activité bactériostatique réversible. Ils sont sensibles à la dureté de l'eau et certains sont susceptibles de subir une hydrolyse partielle dans la solution nettoyante [34].

a) Les savons :

Les premiers TA anioniques utilisés sont les savons, ce sont les sels d'acides carboxyliques $R\text{-}COO^{-}\ M^{+}$, résultant de la saponification de triglycérides d'origine végétale (huile de palme, d'olive, etc…) ou animale [25].

b) Les sulfonates ($R\text{-}SO_3^-$)

Les alkylsulfonates secondaires ou ($RR'HCSO_3^-$) possèdent un bon pouvoir moussant ainsi qu'une bonne solubilité, Leur capacité de mouillage augmente avec la température. Leur coût est élevé et ils sont plutôt utilisés en Europe. Les alkylbenzènesulfonates (ABS, $R\text{-}\Phi\text{-}SO_3^-$) sont encore aujourd'hui les tensioactifs anioniques les plus utilisés. Le radical R peut être linéaire ou branché [34].

Leurs sels sont neutres, résistants à l'hydrolyse acide ou alcaline, et sont peu sensibles à la dureté. Les alkylbenzènesulfonates linéaires (LAS, $R\text{-}\Phi\text{-}SO_3^-$, ou R est un groupement alkyle linéaire), sous-groupe des alkylbenzènesulfonates, en forment aujourd'hui la fraction la plus utilisée, principalement pour des raisons de biodégradabilité (les molécules branchées sont plus difficilement dégradées dans l'environnement). Les LAS possèdent des propriétés moussantes intéressantes et semblent particulièrement adaptés au nettoyage de surfaces dures [34].

Les α-oléfinesulfonates (AOS, $R\text{-}SO_3^-$, R est un groupement α-alcènyl) sont également présents dans quelques préparations industrielles bien que leur application principale soit dans les détergents liquides à vaisselle. Ils sont hautement moussants et possèdent de bonnes propriétés détergentes. Des sulfonaphtalènes ainsi que des fractions de raffinage de pétrole sulfonées sont également disponibles sur le marché. Elles sont caractérisées par de bonnes propriétés dispersantes [34].

c) Les sulfates ($R\text{-}O\text{-}SO_3^-$) :

Les sulfates d'alkyle (FAS, « fatty acid sulfate ») sont considérés comme des tensioactifs d'avenir, principalement à cause de l'origine oléochimique de la partie hydrophobe (alcools gras). Ils sont majoritairement utilisés dans la préparation des poudres. Les très bonnes propriétés détergentes de ces composés sont contrebalancées par leur sensibilité à de fortes concentrations en électrolytes et à la température [34].

De plus l'emploi des FAS nécessite en général l'ajout d'inhibiteurs de mousse en fonction du type d'équipement employé.

Les alkylpolyéthersulfates (AES ou « alcohol ether sulfates », $R\text{-}O\text{-}(CH_2\text{-}CH_2O)\ n\text{-}SO_3^-$ sont des alkylsulfates éthoxylés dont la partie polyoxyéthylénique représente entre 10 et 40 % en masse de la molécule. Ils constituent le 3ième groupe de tensioactifs en volume de vente. Malgré un pouvoir détergent légèrement inférieur

aux alkysulfates non éthoxylés, les AES sont beaucoup moins sensibles à la dureté de l'eau et à la force ionique de la solution de nettoyage. Selon la littérature consultée, les AES seraient particulièrement utilisés dans les préparations de liquides « heavy duty » [34].

Le sous-groupe laurylpolyéthersulfate (« lauryl ether sulfate ») constitue le groupe de composés AES le plus vendu actuellement. Les alkanolamides sulfatés (« sulfated alkanolamides », R (SO_3^-) $CONHCH_2CH_2OH$) forment une famille de tensioactifs efficaces, aux propriétés moussantes intéressantes, particulièrement stables à l'hydrolyse à haute température [34].

d) Les carboxylates (RCOOH) :

Les acides gras (RCOOH) ainsi que leurs esters (RCOOR') sont des tensioactifs sensibles à la dureté de l'eau et plutôt utilisés dans les préparations de soins corporels. Les acides gras éthoxylés (R-(CH_2-CH_2O) n-COOH), moins affectés par la présence de cations métalliques polyvalents et non hydrolysés en milieu alcalin, sont utilisés dans certains produits industriels comme émulsifiants [34].

e) Les tensioactifs anioniques basés sur le phosphore :

Les alkylphosphates (R-O-PO_3^{2-}), les esters d'acide alkylphosphorique (R-O-PO_2HO-R') et les alkylpolyétherphosphates (R-(OCH_2CH_2)n-OPO_3^{2-}), forment un groupe de tensioactifs aux propriétés détergentes modérées mais utilisés dans certaines préparations spécialisées en présence de forte alcalinité et de concentration importante en électrolytes [34].

La littérature technique mentionne également les sulfosuccinates, les esters de sulfo-acides gras, ainsi que les acylaminoacides et leurs sels alcalins. Cependant, leur utilisation semble restreinte, Aux préparations pour les soins corporels, notamment à cause de leur très faible potentiel d'irritation de la peau [34].

I. 4.1.2 Tensioactifs non ioniques :

Ils viennent au deuxième rang par ordre d'importance industrielle avec un peu moins de 40 % du total. En solution aqueuse ils ne s'ionisent pas, car ils possèdent un groupe hydrophile du type alcool, phénol, ester, éther ou même amide. Une forte proportion de ces surfactifs sont rendus relativement hydrophiles grâce à la présence d'une chaîne polyéther de type poly-oxyde d'éthylène. En ce qui concerne le groupe

hydrophobe, c'est souvent un radical alkyle ou alkylbenzène, et parfois une structure d'origine naturelle comme un acide gras quand une basse toxicité est indispensable [33].

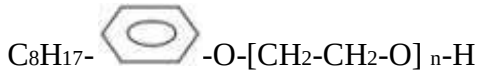


Figure II.4: Tensioactif nonionique : Octyl phenol poly- éthoxylé [33].

Les tensioactifs non ioniques sont caractérisés par une faible sensibilité à la dureté de l'eau et au pH, ainsi que de faibles CMC, permettant une efficacité satisfaisante à basse température et en milieu neutre ou faiblement alcalin. Certains d'entre eux, dont le HLB est bas (inférieur à 8), nécessitent la présence dans la solution nettoyante d'agents hydrotropes pour permettre leur solubilisation [34].
Le pouvoir détergent des tensioactifs non ioniques est considéré optimal lorsque la température est juste en dessous du point trouble. La valeur de ce paramètre peut être modifiée par la présence dans la solution nettoyante d'électrolytes ou d'autres agents tensioactifs, notamment anioniques. De la même façon que pour les tensioactifs anioniques, les paragraphes suivants fournissent une liste des principales classes de non ioniques susceptibles de se retrouver dans les produits nettoyants industriels, ainsi que leurs caractéristiques et spécificités majeures [34].

a)Les alcools gras (alcanediols en C_{10}-C_{20}) :

Les alcools gras sont principalement utilisés comme précurseurs dans la synthèse de molécules de tensioactifs plus complexes. Ils peuvent néanmoins servir de coémulsifiants pour des composés peu solubles dans l'eau [34].

b) Les éthers :

Les alcools alkoxylés (éthoxylés ou propoxylés (R-O-(CH_2-CH_2-(CH_2)-O) n-H)) forment la famille chimique principale de tensioactifs non ioniques en volume de production. Ils sont en général stables en solution, et leur degré d'hydrophilie peut être ajusté en modifiant le niveau d'éthoxylation lors de la réaction de synthèse. Le groupement propoxy étant trop peu hydrophile pour garantir la solubilité, la présence concomitante de groupements éthoxy est parfois nécessaire. Ces

composés, peu sensibles à la dureté de l'eau, sont compatibles avec la majorité des tensioactifs anioniques avec lesquels il agissent de façon synergique dans la solution de nettoyage. Les alcools éthoxylés sont actuellement les tensioactifs les plus vendus sur le marché des détergents liquides [34].

Ils possèdent notamment des propriétés de mouillage, de dispersion et d'émulsification très intéressantes. Les alkyléthers éthoxy / propoxy (« EO / PO alkyl ethers »), qui contiennent une proportion de groupements propoxy dans leur partie hydrophile, sont moins solubles dans l'eau et possèdent des propriétés d'inhibition de la formation de mousse. Les alkylphénol éthoxylates (APE, R-Φ-(OCH_2-CH_2) n-O) sont largement utilisés dans les préparations de nettoyants alcalins pour les métaux. Le radical R est le plus souvent un groupement nonyl ou octyl, branché plutôt que linéaire pour favoriser la détergence et la solubilité. Les copolymères polyoxyalkylène (POA, « EO / PO block copolymer ») sont également largement utilisés dans les détergents industriels pour le nettoyage du métal. Ces composés possèdent de fortes capacités de détergence, de mouillage, de dispersion et de solubilisation. Ils peuvent également servir d'agents de rinçage [34].

Un intérêt spécifique dans certaines conditions de nettoyage provient également de leur propension à inhiber la formation de mousse. Deux structures chimiques possibles les séparent en deux sous-groupes : les éthers de polyéthylène glycol propoxylés pour lesquels la partie hydrophile constituée des groupements polymérisés éthoxy est au centre de la molécule dont les extrémités sont constituées par des groupements propoxy (PPG – PEG – PPG), et les éthers de polypropylène glycol éthoxylés pour lesquels c'est la partie constituée de groupement hydophobes propoxy qui est au centre, entourées de groupements éthoxy (PEG – PPG – PEG) [34].

c) Les alkyls polyglucosides (APG, R-O-(Glu) n) :

Les alkyls polyglucosides sont également employés dans les nettoyants aqueux. Ils sont caractérisés par de bonnes propriétés de mouillage et d'émulsification, et leur efficacité est peu influencée par la dureté de l'eau ou la teneur en électrolytes.
Les alkylpolyglucosides sont plus coûteux que les éthoxylates mais l'argument de vente réside dans l'exploitation de matières renouvelables (leur synthèse est effectuée à partir du sucre) [34].

d) Les alkanolamides ($RCONHCH_2CH_2OH$ ou $RCON(CH_2CH_2OH)_2$) :

Les alkanolamides non sulfatés sont également utilisés comme tensioactifs. Ils sont obtenus par condensation d'acides gras et d'hydroxyalkylamines (principalement monoéthanolamine et diéthanolamine). Deux procédés de synthèse distincts permettent d'aboutir soit à un produit majoritairement constitué d'alkanolamide, soit à un mélange contenant également des amines et des esters d'amine et d'amide, caractérisé par une meilleure solubilité dans l'eau. Les alkanolamides, bien que leurs propriétés détergentes soient limitées, sont utilisés pour leurs propriétés dispersantes, de stabilisation de la mousse et anticorrosion [34].

e) Les acides gras éthoxylés ($R\text{-}COO\text{-}(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)\ n\text{-}H$) :

Ces composés sont utilisés dans les dégraissants industriels et décapants pour leurs très bonnes capacités à émulsifier les huiles et graisses. Ils ne possèdent cependant pas de pouvoir mouillant ou moussant satisfaisant et sont hydrolysés en milieux alcalins [34].

f) Les oxydes d'amine ($R\text{-}N(CH_3)_2\text{-}O$) :

Ces composés, parfois classifiés cationiques (l'atome d'azote est protoné en milieu acide), sont utilisés le plus souvent comme stabilisateurs de mousse. Leur forte polarité leur permet notamment d'interagir avec les tensioactifs anioniques par liaison hydrogène et de maintenir leur solubilité dans l'eau pour des concentrations élevées en électrolytes.rapporte que les oxydes d'amine sont le plus souvent utilisés en conjonction avec les alkylsulfates et les alkylpolyéthersulfates dans les détergents à vaisselle [35].

g) Les glucamides d'acides gras (« fatty acid glucamide », FAGA) ou polyhydroxyamides (PHA) :

Ces tensioactifs sont très utilisés en Amérique du Nord dans les détergents liquides « heavy duty » comme produits de substitution des LAS (alkylbenzènesulfonates linéaires). Leur partie polaire plus compacte que celle des composés éthoxylés, permet notamment d'obtenir avec les tensioactifs anioniques de la préparation des interactions plus efficaces que les composés polyéthoxylés. Les PHA sont également moins coûteux que les alkylpolyglucosides tout en ayant des propriétés similaires [34].

II.4.1.3 Tensioactifs cationiques :

Les tensioactifs cationiques possèdent une charge positive sur leur partie hydrophile, en général dérivée de sels d'ammonium quaternaire. McLaughlin et Zisman, ainsi que Peterson, soulignent que ces composés sont rarement présents dans les nettoyants industriels alcalins, principalement en raison de leur trop forte affinité pour les substrats rencontrés qui sont généralement chargés négativement (en particulier les métaux), et de leur incompatibilité avec les agents anioniques dans la plupart des cas [36].

Les tensioactifs cationiques sont principalement utilisés pour leurs propriétés fongicides et bactéricides irréversibles que leur confère leur caractère nitré, ainsi que dans certaines préparations nettoyantes acides [37].

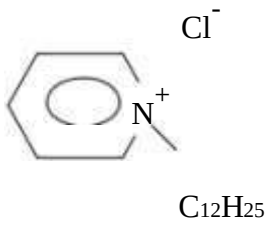


Figure II.5 : Tensioactif cationique Chlorure de n-dodécyl pyridine [33].

II .4.1.4 Tensioactifs zwitterioniques ou amphotères :

Les surfactants dits amphotères possèdent deux groupes fonctionnels, l'un anionique, l'autre cationique. Dans la plupart des cas, c'est le pH qui détermine le caractère dominant du fait qu'il favorise l'une ou l'autre des dissociations possibles : anionique à pH alcalin, cationique à pH acide. Près de leur point isoélectrique, ils sont réellement amphotères.

C'est-à- dire qu'ils possèdent les deux charges à la fois, et présentent souvent un minimum d'activité superficielle. Ces surfactants sont en général très peu irritants, compatibles avec les autres surfactants et dans la plupart des cas, ils peuvent s'utiliser dans des formules pharmaceutiques ou cosmétiques [33].

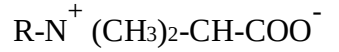


Figure II.6: Tensioactif amphotère : Alkyl bétaine [33].

II .4.2 Les tensioactifs naturels (biosurfactants) :

II .4.2.1 Définition :

Les surfactants (SURFace ACTive AgeNTS) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) [38]. Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système [39]. Et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures [40].

La tension superficielle de l'eau peut être réduite de 72 mN/m jusqu'à 27 mN/ m en présence d'un surfactant, synthétique ou naturel [41].Mais cette capacité reste relative et varie d'un surfactant à un autre.

II .4.2.2 Structure et classification des biosurfactants :

Il s'agit de molécules amphiphiles [40] ,constituées de deux pôles: un pôle hydrophile, qui peut être un ester, un hydroxyle, un phosphate, un carboxyle, ou encore un groupe d'hydrates de carbone et peut avoir une charge neutre ou négative, et un pôle hydrophobe qui est un acide gras [42] ,Hydroxylé, saturé ou insaturé, et peut être aussi un peptide [43], Selon plusieurs auteurs (Kosaric et coll., 1983, Rosenberg et coll., 1993, Desai et coll., 1997, Prommachan, 2002, Al-Arajil et coll., 2007, Mulligan, 2009) .

Les classes majeures de biosurfactants sont différenciées essentiellement par leur composition chimique et leur origine microbienne (Tableau 1).

Tableau 1 : Source microbienne et principaux types de biosurfactants [44].

Biosurfactant	Organisme	Référence(s)
Glycolipides :		
Rhamnolipides	*Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas sp*.	Guerra-Santos L. et *coll*., 1984, Robert M. et *coll*., 1989 Hisatsuka K. et *coll*., 1972, Lang S. et *coll*. 1987, Parra J. et *coll*. 1989
Trehalolipides	*Rhodococcus erythropolis* *Nocardia erythropolis* *Mycobacterium sp.*	Rapp P. et *coll*., 1979 Margaritis A. et *coll*., 1979,1980, Cooper D.G. et *coll*., 1989
Sophorolipides	*Torulopsis bombicola* *T. apicola* *T. petrophilum* *Ustilago zeae, U.maydis*	Cooper D.G. et *coll*., 1989, Gobbert U. et *coll*.1984 Hommel R. et *coll*., 1987, Tulloch P. et *coll*., 1967 Cooper D. G. et *coll*., 1983 Boothroyd, B. et *coll*. 1956,Syldack, C. 1985
Lipopeptides et lipoprotéines		
Peptides-lipides	*Bacillus licheniformis*	Javaheri, M. et *coll*., 1985, Yakimov, M. et *coll*., 1996
Serrawettine	*Serratia marcescens*	Matsuyama, T. et *coll*.1991
Viscosine	*P. fluorescens*	Neu, T. et *coll*., 1990
Surfactine	*B. subtilis*	Arima, K. et *coll*., 1968, Bernheimer, A. W. et *coll*., 1970
Subtilisine	*B. subtilis*	Bernheimer, A. W. et *coll*., 1970
Gramicidines	*B. brevis*	Marahiel, M. et *coll*., 1977
Polymyxines	*B. polymyxa*	Suzuki, T. et *coll*., 1965
Acide gras, lipides neutres et phospholipides		
Acide gras	*Candida lepus*	Cooper D.G. et *coll*., 1989, Cooper D.G. et *coll*., 1978
lipides neutre	*N. erythropolis*	MacDonald, C. R. et *coll*., 1981
phospholipides	*Thiobacillus thiooxidans*	Beeba, J. L. et *coll*., 1971
Surfactants polymériques		
Emulsane	*Acinétobacter calcoaceticus*	Rosenberg, E. et *coll*., 1979, Zosim, Z., 1982
Biodispersane	*A. calcoaceticus*	Rosenberg, E. et *coll*., 1988
Mannane-lipide-proteine	*Candida tropicalis*	Kappeli, O. et *coll*., 1984
Liposane	*C. lipolytica*	Cirigliano, M. C. et *coll*., 1984, 1985
Hydrates de	*P. fluorescens*	Desai, A. J. et *coll*., 1988, Persson, A. et *coll*., 1988
carbone-proteine-lipide	*Debaryomyces polymorphis*	Singh, M.et *coll*., 1989
Proteine PA	*P. aeruginosa*	Hisatsuka, K. et *coll*., 1972, 1977
Biosurfactants particuliers		
Vesicles et fimbriae	*A . calcoaceticus*	Gutnick, D. L. et *coll*., 1987, Kappeli, O. et *coll*., 1979
La cellule entière	variété de bactéries	Fattom, A. et *coll*., 1985, Roggiani, M. et *coll*., 1993

II .4.2.3 Rôle des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures :

Il existe une relation claire entre l'activité d'émulsification, l'adhérence des cellules à l'hydrocarbure, et le taux de croissance des isolats sur le pétrole brut [45].

Une étude très récente sur des bactéries (*Pseudomonas sp*) capables de dégrader le n-héxadecane en produisant des biosurfactants était faite par Cameotra et ces collaborateurs (2009) pour élucider ce mécanisme.

En présence de n-héxadecane dans le milieu de culture, les bactéries secrètent des substances qui forment un réseau de projections extracellulaires reliant les cellules les unes aux autres. Ce réseau est supposé être un complexe de biosurfactants et

d'alcanes qui forme un site d'ancrage des cellules et un moyen de transport d'hydrocarbures à leur surface cellulaire. Le biosurfactant disperse l'héxadécane en petites gouttelettes, et forme une couche autours de chacune, augmentant ainsi ça disponibilité aux organismes dégradants [46].

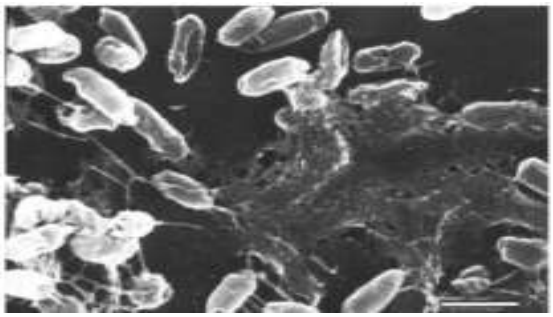


Figure II.7 : Observation sous microscope électronique du réseau formé par la souche *Pseudomonas sp*. SSC2 cultivé sur 2% de n-hexadecane [46].

L'étude ultra-structurale a montré qu'un processus semblable à la pinocytose active prend place pour la pénétration des gouttelettes d'hydrocarbure à l'intérieur de la cellule bactérienne [46].

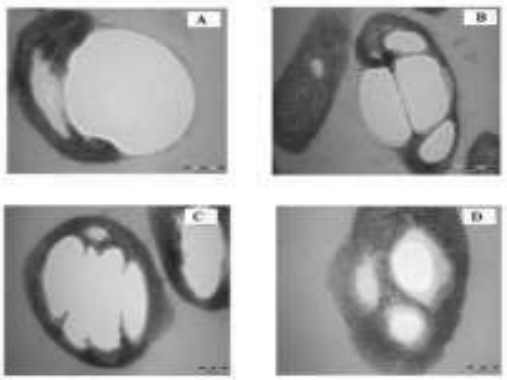


Figure II.8 : Observation sous microscope électronique à transmission de gouttelettes d'héxadecane englouties par la souche Pseudomonas sp. SSC2, Morgagni TEM [46].

II .5 Effets des tensioactifs sur une station d'épuration :

Les tensioactifs vont également poser des problèmes si on les retrouve en trop forte concentration à leur arrivée dans la station d'épuration. Leur capacité à former des mousses pose problème quant à l'oxygénation des bassins aérés pour des

traitements aérobies. En effet, cette mousse agit comme une membrane étanche et limite les échanges d'air à la surface des bassins [47].

Ceci peut nuire à la survie des bactéries et peut ainsi abaisser le rendement épuratoire de la station. D'autre part, les tensioactifs peuvent avoir un pouvoir dispersant sur certaines matières en suspension et limiter ainsi la décantation. La encore le rendement épuratoire de la station d'épuration en sera affecté [47].

Enfin, les tensioactifs ont la capacité de mettre en émulsion les graisses et hydrocarbures, ces substances vont ainsi passer au travers des traitements qui sont censés les retirer de l'eau. Là encore, le rendement épuratoire de la station sera affecté. Il faut rajouter que les tensioactifs se retrouvent dans les produits finaux du traitement (rejet final vers le milieu et boues). Ils se retrouvent donc dans l'environnement. Une étude menée sur un réacteur anaérobie contaminé par différentes concentrations en tensioactifs anioniques, cationiques, non ioniques et amphotères issus de produits domestiques et industriels montre une détérioration de la performance du digesteur (après 7 jours) dès une concentration de 1mL/L [47].

II .6 Domaines d'application des tensioactifs :

Les domaines d'application des tensioactifs sont multiples,

II .6.1 secteur de la détergence :

Les tensioactifs entrent dans la formulation de tous les détergents et représentent en moyenne 20% de leur composition. Il convient de distinguer la détergence ménagère et la détergence industrielle,

Cette dernière concernant en grande partie le secteur de l'agroalimentaire. La détergence ménagère quanta elle regroupe plusieurs classes de produits tels que les lessives, les adoucissants, les produits vaisselle et les produits d'entretien. À noter que le secteur des lessives est le plus gros consommateur de tensioactifs avec plus de 50% du marché [25].

II .6.2 secteur de la cosmétique :

On distingue deux grands domaines, la cosmétique rincée (produits d'hygiène tels que les shampooings, gels douches, dentifrices) et la cosmétique blanche (produits de beauté tels que les crèmes, laits, maquillages et autres produits de soin). La

cosmétique rincée utilise les tensioactifs pour leur propriété détergente tandis que la cosmétique blanche privilégie le pouvoir adoucissant et émulsifiant [25].

II .6.3 secteur industriel :

Outre la détergence et la cosmétique, les domaines d'application des tensioactifs sont nombreux : les industries des additifs alimentaires, des céramiques, des matières plastiques, des peintures, du cuir, du papier, du pétrole, du phytosanitaire et engrais, également la métallurgie et le textile.
Le tableau 2 énumère de manière non exhaustive les secteurs visés et l'usage qu'il en est fait :

Tableau 2 : Exemples d'applications des tensioactifs dans le secteur industriel [25].

type d'activité	*mode d'utilisation des tensioactifs*
Cuir	propriétés mouillantes et détergentes pour la préparation des peaux au tannage
Matières plastiques	Dispersion de PVC, caractère antistatique
Métallurgie	nettoyage et dégraissage des métaux, inhibiteur de corrosion
Peintures	stabilisation des formulations, mouillage des pigments, ajoute un caractère hydrophobe aux peinture antirouille
Textile	lubrification des fibres, lavage et teinture des fibres traités
Phytosanitaire et Engrais	maintien du conditionnement sous forme de granulés empêche l'agglomération des substrats

II .7 Les différentes applications selon le type de tensioactif :

Le terme tensioactif se réfère à une propriété physicochimique du composé. Toutefois, suivant leurs applications, on retrouve ces molécules sous les qualificatifs de savon, détergent, humectant, dispersant, émulsifiant, moussant, bactéricide, antistatique, inhibiteur de corrosion [25].

Tableau 3 : Les grandes familles de tensioactifs et leurs applications [25].

FAMILLE DE TENSIOACTIFS	PRINCIPAUX	UTILISATION
ANIONIQUE		
savons $R\text{-}COO^- Na^+$	- les plus courants - peu onéreux - n'irritent pas la peau - bonne biodégradabilité	détergent
alkylsulfate $R\text{-}O\text{-}SO_3^- Na^+$		agent moussant (shampooing, dentifrice), humectant et détergent (liquide vaisselle)
alkylbenzène sulfonate linéaire (LAS)		agent émulsifiant, dispersant et détergent
CATIONIQUE		
ammonium quaternaire $^+$	charge positive qui leur permet de s'adsorber sur des substrats chargés négativement	agent antistatique et adoucissant (produits de rinçage linge et cheveux) bactéricide (désinfectants chirurgicaux, antiseptiques)
ZWITTERIONIQUE		
alkylbétaïne alkylsulfobétaïne dérivés d'acides aminés	peu agressifs pour les tissus vivants compatibles avec toutes les autres classes de tensioactifs	adoucissant pour textile et cheveux additif inhibiteur de corrosion
NON IONIQUE		
alcools éthoxylés $R\text{-}(O\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_n\text{-}OH$ alkylphénols éthoxylés	peu biodégradables	détergent (6 à 10 OE) dispersant, humectant et émulsifiant (liquide vaisselle et linge) (n>10 OE)
alkylpolyglycosides (APG)	- très bas niveau de toxicité - pas sensible au pH - non irritant - bonne synergie avec les autres tensioactifs	C8-C10 : agent moussant dans l'agrochimie C12-C16 : co-tensioactif en détergence soins corporels
alkylglucamides		formulation pour shampooing et gel douche
esters de glycérol esters d'hexitols		agent émulsifiant dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique

II .8 Propriétés des agents tensioactifs :

Afin de définir quelques critères de choix des tensioactifs pour une utilisation donnée, il est nécessaire de rappeler quelques concepts de base concernant les propriétés des composés tensioactifs.

Les deux propriétés essentielles des composés tensioactifs qui permettent de comprendre les phénomènes observés et qui déterminent leurs domaines d'application sont :

- l'adsorption aux interfaces qui provoque une diminution des tensions interfaciales. Cette propriété est responsable des phénomènes de mouillage, de dispersion, de détergence et d'émulsification.
- l'autoagrégation en solution ou micellisation qui gouverne les propriétés desolubilisation et de microémulsification [48].

Chapitre III :
Pollution et dépollution d'un rejet



III. La pollution des eaux

III .1 Introduction

La pollution de l'eau s'entend comme, une modification défavorable ou nocive des propriétés physico-chimiques et biologiques, produite directement ou indirectement par les activités humaines, les rendant impropres à l'utilisation normale établit.
Les eaux usées sont toutes les eaux des activités domestiques, agricoles et industrielles chargées en substances toxiques qui parviennent dans les canalisations d'assainissement, Les eaux usées englobent également les eaux de pluies et leur charge polluante, elles engendrent au milieu récepteur toutes sortes de pollution et de nuisance [49].
La lutte contre cette pollution est d'autant plus difficile que ce qui est au fond de l'eau, ou dilué dans l'eau est souvent invisible, et que certains toxiques infiltrés dans le sol ne produisent souvent leur effet qu'après un long délai et que de nombreux polluants agissent en synergies complexes [50].

III .2 Les eaux usées

III .2.1 Définition :

Les eaux usées sont des liquides de composition hétérogène , chargées de matières minérales ou organiques , pouvant être en suspension ou en solution, et dont certains peuvent avoir un caractère toxique. L'eau usée est l'eau qui a été utilisée et qui doit être traité avant d'être réintroduite vers d'autres sources d'eaux pour qu'ils ne causent pas de pollution de ces autres sources. Les eaux usées proviennent de plusieurs sources [51].
Tout ce que vous évacuez en tirant la chasse d'eau et lorsque vous utilisez vos éviers est considérer comme de l'eau usée. Les eaux usées, qui sont un mélange de plusieurs types d'eaux et pour éviter la pollution, sont acheminées par un réseau d'assainissement vers une station d'épuration pour y être traitées et si possible réutilisées [51].

III .2.2 Origine de la pollution des eaux

La pollution des eaux est provoquée par le rejet d'eau salie par nos activités domestiques, mais également par les diverses activités industrielles et agricoles [52].

La pollution de l'eau est une altération qui rend son utilisation dangereuse et (ou) perturbe l'écosystème aquatique. Selon Eckenfelder (1982), les eaux usées proviennent de quatre sources principales:

1- Les eaux usées domestiques.
2- Les eaux usées industrielles.
3- Les eaux de pluie et de ruissellement dans les villes.
4- Le ruissellement dans les zones agricoles [53].

III .2.2.1 La pollution physique

La pollution physique est provoquée essentiellement par les centrales thermiques qui sont situées le plus souvent aux abords des cours d'eaux, puisent de grandes quantités pour le refroidissement de leurs systèmes. Cette eau réchauffée est ensuite déversée dans le milieu naturel. Ce qui a pour effet d'en modifier fortement la flore et la faune, car la variation de température est un paramètre écologique très important [54].

III .2.2.2 La pollution chimique

L'utilisation de diverses substances chimiques pour le besoin, du développement industriel, a entraîné dans presque toutes les régions du monde, Une dissémination dans le milieu naturel, d'une multitude de résidus toxiques. Ces substances présentent habituellement dans les eaux à l'état de traces, sont le plus souvent capables de s'accumuler dans les tissus végétaux, animaux et de se concentrer au niveau des différentes chaînes et des concentrations dangereuses en fin de chaîne « animaux supérieurs et l'homme » [54].

Actuellement les différents types de polluants chimiques sont :

III .2.2.2.1 Les substances chimiques indésirables

Ce sont des substances dont la présence dans l'eau est tolérée, tant qu'elle reste Inférieure à un certain seuil tel que les nitrates et les phosphates dont l'origine principale et le lessivage des terres agricoles fertilisées à l'aide d'engrais azotés et phosphatés [54].

III .2.2.2.2 Les nitrates et autres composés azotés

L'ensemble des réactions biologiques de croissance et de maintenance requièrent la présence de l'élément azoté. En effet il constitue entre 16 et 23% des protéines cellulaires et environ 12% des acides nucléiques. La forme azotée la plus abondante et la plus stable est (N_2), représentant 79% de l'atmosphère [54].

Toutes les formes d'azote (azote organique, ammoniaque, nitrites, etc.) sont susceptibles d'être à l'origine des nitrates par un processus d'oxydation biologique, les nitrates (azote minéral azoté) sont très solubles.

Une bonne part des nitrates vient des usines d'engrais qui fixent l'azote minéral de l'air pour fabriquer de l'ammoniac, ultérieurement oxydé. Quand les nitrates sont épandus sur un sol nu ou gelé, ils s'infiltrent avec les pluies ou sont lessivés en surface. Au contraire, épandus au printemps et à la bonne dose, ils sont absorbés par les plantes cultivées. Dans les eaux naturelles non polluées, le taux de nitrates est très variable (de 1 à 15 mg/L) suivant la saison et l'origine des eaux. Sauf cas particuliers, les teneurs en nitrates des eaux de distribution sont peu élevées. Par contre en zone rurale, certains puits à usage familial peuvent avoir des concentrations importantes [54].

L'explosion démographique et le développement de l'agriculture et de l'industrie, depuis quelques décennies, ont modifié le cycle biogéochimique de l'azote vers une production accrue de nitrates qui sont entraînés vers les eaux souterraines.

Depuis quelques années, il a été observé une élévation lente mais inexorable et sans amorce de la stabilisation de la teneur en nitrates dans les eaux souterraines et superficielles de certaines régions. Celle-ci est souvent liée au développement des élevages, à une fertilisation excessive des zones agricoles par les engrais, les fientes, fumiers (déjections+litières) et lisiers (déjections seules) divers. La migration

des nitrates est nettement plus rapide sur les surfaces cultivables laissées à nues pendant l'hiver. Les rejets des collectivités et occasionnellement de certaines industries (engrais chimiques azotés, oxydants,…) peuvent aussi concourir à l'enrichissement des eaux en nitrates [54]. L'ammonium présent dans les nappes à régime libre est généralement issu de la dégradation incomplète de la matière organique, c'est un marqueur de pollution organique et de contamination microbiologique. Les nitrites, qui dans le cycle de l'azote s'insèrent entre les nitrates et l'ammoniaque, sont très peu stables et par conséquent, très peu présents dans les eaux souterraines sauf en cas d'une pollution de surface proche : les nitrites sont donc de bons indices de contamination organique et bactériologique [54].

III .2.2.2.3 La pollution phosphatée

Le phosphore constitue, avec les nitrates, les principaux éléments nutritifs de la flore aquatique. A trop forte dose, il y a prolifération d'algues, et donc eutrophisation des cours d'eau. Les effets, liés à cette présence excessive de végétation aquatique, sont essentiellement de deux types :

-Variation de pH, qui est élevée le jour, et proche de la neutralité la nuit.

-Variation de la concentration de l'oxygène dissous, qui sera élevé le jour, et très faible la nuit.

Les conséquences principales sont une mortalité importante de la vie piscicole due au manque d'oxygène et la toxicité de l'ammoniac en milieu basique. On pourrait penser qu'éliminer l'azote suffirait pour lutter contre les problèmes d'eutrophisation, mais d'une part, certaines algues sont capables de fixer l'azote atmosphérique, et d'autre part la majorité des apports en azote sont faits de manière diffuse, ce qui rend d'autant plus difficile leur élimination [54]. Par contre, il faut savoir que 42% des apports en phosphore sont d'origines ponctuelles (industries, collectivités…). Ceux-ci en termes de gestion, représentent un levier d'action considérable dans la mesure où ils sont les apports que l'on pourra maîtriser le plus facilement.

Le phosphore présent dans les eaux peut avoir trois origines :

- Les apports diffus d'origine agricole : dû aux élevages intensifs, à la fertilisation agricole (qu'il s'agit d'engrais de ferme ou d'engrais commerciaux) ou aux pratiques culturelles ;

- Les apports industriels : les activités les plus impliquées sont les usines de fabrication d'engrais, les industries agroalimentaires et de pâte de papier.
- Les apports domestiques : un habitant est considéré comme rejetant de 4 gr de phosphore par jour. Cette contribution unitaire peut être scindée en deux parties sensiblement «équivalentes, le phosphore métabolique et le phosphore dû aux formations détergentes [54].

Dans les eaux résiduaires, le phosphore peut se trouver sous différentes formes chimiques; le phosphore organique insoluble ou dissous, l'orthophosphate (PO_4^{-3}), le phosphate inorganique condensé et les polyphosphates. Mais il s'avère en réalité qu'environ 50% et jusqu'à 70% de phosphore sont présents sous forme d'orthophosphate [54].

III .2.2.2.4 Les pesticides

Le terme "pesticides" est une appellation générique couvrant toutes les substances ou produits qui éliminent les organismes considérés comme nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications.
Ce sont des poisons destinés à tuer les herbes (herbicides), les insectes (insecticides), à lutter contre les maladies (fongicides), ou à se débarrasser de divers animaux jugés nuisibles (souricides, …). Les pesticides se retrouvent partout : dans nos aliments, dans l'eau des rivières et dans l'eau souterraine, dans l'air, dans les sols, dans la biomasse vivante et morte, dans le sang et le lait maternel... Ils représentent par conséquent un danger pour l'homme mais aussi pour l'environnement.

Leurs utilisations peuvent être très diverses, depuis les applications au champ, jusqu'au désherbage des parcs, trottoirs et voies ferrées, la désinfection des silos, le traitement des jardins d'amateurs et des espaces verts. Il faut également souligner l'existence des "biocides", pesticides réservés à des usages domestiques tels la destruction des rats, souris, blattes, mites ou encore la protection des bois contre les champignons ou les termites [55].

III .2.2.2.5 Les détergents

Un détergent est un composé chimique, généralement issu du pétrole, doté de propriétés tensioactives, ce qui le rend capable d'enlever les salissures. Toutefois ces derniers ne sont pas conséquences. Les plus nocifs sont les détergents

anioniques qu'on retrouve dans certaines lessives. Les phosphates constituent un des ingrédients les plus utilisés et les plus abondants dans les détergents domestiques et industriels. Ils ont pour fonction de réduire la dureté de l'eau afin de permettre un nettoyage efficace par les détergents [55].
Les phosphates sont des nutriments essentiels comme le montre leur utilisation dans les engrais. La principale préoccupation relative à l'utilisation des phosphates dans les détergents est qu'elle peut conduire à un excès de nutriments dans l'environnement aquatique ce qui, à son tour, peut provoquer des problèmes d'eutrophisation. Les inconvénients principaux de l'eutrophisation sont la diminution de la biodiversité et de la qualité de l'eau en tant que ressource. On constate notamment :l'augmentation du volume d'algue, l'augmentation de la biomasse du zooplancton gélatineux, la dégradation des qualités organoleptiques de l'eau, l'envasement plus rapide, et apparition de vase putride, sombre et malodorante, le développement de phytoplancton toxique, le développement de pathogènes par diminution de la pénétration des UV qui ont un pouvoir désinfectant, la diminution de l'indice biotique et enfin une perte de biodiversité dans les milieux aquatiques. L'impact des détergents à base de phosphates sur l'eutrophisation est très variable d'un pays à un autre ainsi que dans les différents bassins hydrographiques en fonction des activités humaines et de l'utilisation du sol [55].

III .2.2.2.6 Les produits chimiques toxiques

On distingue généralement deux catégories :

- Les sels de métaux lourds : Plomb, mercure, cadmium, chrome,… etc. présents dans la nature à très petites quantités et dont les rejets industriels chimiques et métallurgiques augmentent la concentration dans les eaux.

Ces derniers non directement nocifs à des faibles concentrations, ont cependant, la faculté de s'accumuler aux cours de différents niveaux de la chaîne alimentaire et d'atteindre ainsi des concentrations dangereuses en fin de chaîne.

- Les hydrocarbures : les principales sources de pollution des eaux par les hydrocarbures sont les déversements accidentels qui constituent une grave menace pour l'équilibre écologique. Plusieurs milliers de m^3/h se déversent dans la rivière où elles ont été prélevées dans la mer [54].

III .2.2.3 Impureté de nature biologique

Toutes les eaux sont susceptibles d'être polluées par des micro-organismes. L'eau destinée à l'utilisation par l'homme doit être autant que possible indemne de contamination par des bactéries ou des virus pathogènes. Cette règle étant particulièrement stricte si l'eau doit être utilisée pour l'alimentation ou l'industrie alimentaire : elle doit dans ce cas être indemne de pathogènes.

Les germes pathogènes pour l'homme sont nombreux et de détermination délicate, au fait de leur faible concentration dans les eaux. Aussi, compte tenu de l'origine intestinale préférentielle des bactéries et des virus pathogènes des eaux, d'une part, et d'autre part, de l'élimination massive de commensaux de l'intestin par chacun des individus d'une population donnée [54].

III .2.2.3.1 Les bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires simples et sans noyau. Leur taille est comprise entre 0,1 et 10 µm. Le taux moyen de bactéries dans les fèces est d'environ 1012 bactéries/g (ASANO, 1998). Les bactéries sont les microorganismes les plus communément rencontrés dans les eaux usées (TOZE, 1999). Les eaux usées urbaines contiennent environ 106 à 107 bactéries/100 ml dont la plupart sont des proteus et des entérobactéries, 103 à 104 streptocoques et 102 à 103 clostridiums. La concentration en bactéries pathogènes est de l'ordre de 104 germes/l. Parmi les plus détectées sont retrouvées, les salmonelles, dont celles responsables de la typhoïde, des paratyphoïdes et des troubles intestinaux. Les coliformes thermotolérants sont des germes témoins de contamination fécale communément utilisés pour contrôler la qualité relative d'une eau (BELAID, 2010) [56].

III .2.2.3.2 Les virus

Ce sont des organismes infectieux de très petite taille (10 à 350 nm) qui se reproduisent en infectant un organisme hôte. Les virus ne sont pas naturellement présents dans l'intestin, contrairement aux bactéries. Ils sont présents soit intentionnellement (après une vaccination contre la poliomyélite, par exemple), soit chez un individu infecté accidentellement (BAUMONT et al, 2005). On estime leur concentration dans les eaux usées urbaines comprise entre 103 et 104 particules par litre. Leur isolement et leur dénombrement dans les eaux usées restent difficiles, ce

qui conduit vraisemblablement à une sous estimation de leur nombre réel. Les virus entériques sont ceux qui se multiplient dans le trajet intestinal. Parmi les virus entériques humains les plus nombreux, nous nous citerons les entérovirus (exemple : polio), les rota virus, les rétrovirus, les adénovirus et le virus de l'Hépatite A. Il semble que les virus soient plus résistants dans l'environnement que les bactéries (AULICINO et al, 1996) [56].

III .2.2.3.3 Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes unicellulaires munis d'un noyau, plus complexes et plus gros que les bactéries. La plupart des protozoaires pathogènes sont des organismes parasites, c'est-à-dire qu'ils se développent aux dépens de leur hôte. Certains protozoaires adoptent au cours de leur cycle vital une forme de résistance, appelée kyste qui peut être véhiculé par les eaux résiduaires. Cette forme peut résister généralement aux procédés de traitements des eaux usées (BAUMONT et al, 2005). Ainsi, selon les conditions du milieu, ces organismes peuvent survivre plusieurs semaines voir même plusieurs années. En revanche, 10 à 30 kystes, est une dose suffisante pour causer des troubles sanitaires (CAMPOS, 2008) [56].

III .2.2.3.4 Les helminthes

Les helminthes sont des vers multicellulaires. Tout comme les protozoaires, ce sont majoritairement des organismes parasites rencontrés dans les eaux résiduaires. Le nombre d'œufs d'helminthes peut être évalué entre 10 et 103 germes/l (FABY et BRISSAUD, 1997). Le stade infectieux de certains helminthes est l'organisme adulte ou larve, alors que pour d'autres, ce sont les œufs. Les œufs et les larves sont résistants dans l'environnement et le risque lié à leur présence est à considérer pour le traitement et la réutilisation des eaux résiduaires [56].

En effet, la persistance de ces organismes à différentes conditions environnementales ainsi que leur résistance à la désinfection permet leur reproduction, ce qui constitue leur risque potentiel (CAMPOS, 2008).

Les helminthes pathogènes rencontrés dans les eaux usées sont : Ascaris lumbricades, Oxyuris vermicularis, Trichuris trichuria, Taenia saginata. L'analyse des risques sanitaires liés aux agents pathogènes susceptibles d'être transportés par les eaux usées est le fondement des recommandations proposées par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1989 (OMS, 1989) [56].

III .2.2.4 La pollution organique

La pollution organique des eaux est le résultat de rejets de certaines industries agro-alimentaires hautement polluantes telles que les abattoirs, laiteries, sucreries, etc…

III .3 Caractéristiques des eaux usées

Les normes de rejet des eaux usées, fixent des indicateurs de qualité physico-chimique et biologique. Ce potentiel de pollution généralement exprimés en mg/l, est quantifié et apprécié par une série d'analyses. Certains de ces paramètres sont indicateurs de modifications que cette eau sera susceptible d'apporter aux milieux naturels récepteurs. Pour les eaux usées domestiques, industrielles et les effluents naturels [49], on peut retenir les analyses suivantes :

III .3.1 Les paramètres physico-chimiques

Ils résultent de l'introduction dans un milieu des substances conduisant à son altération, se traduisant généralement par des modifications des caractéristiques physico- chimiques du milieu récepteur. La mesure de ces paramètres se fait au niveau des rejets, à l'entrée et à la sortie des usines de traitement et dans les milieux naturels [49].

III .3.1.1 La température

La température est un facteur écologique important des milieux aqueux. Son élévation peut perturber fortement la vie aquatique (pollution thermique). Elle joue un rôle important dans la nitrification et la dénitrification biologique. La nitrification est optimale pour des températures variant de 28 à 32°C par contre, elle est fortement diminuée pour des températures de 12 à 15°C et elle s'arrête pour des températures inférieures à 5°C (Bollags JM 1973 ; Rodier et al, 2005) [49].

III .3.1.2 Le potentiel d'Hydrogène (pH)

Les organismes sont très sensibles aux variations du pH, et un développement correct de la faune et de la flore aquatique n'est possible que si sa valeur est comprise entre 6 et 9. L'influence du pH se fait également ressentir par le rôle qu'il exerce sur les autres éléments comme les ions des métaux dont il peut diminuer ou augmenter leur mobilité en solution biodisponible et donc leur toxicité. Le pH joue un rôle important dans l'épuration d'un effluent et le développement bactérien. La

nitrification optimale ne se fait qu'à des valeurs de pH comprises entre 7,5 et 9 [49].

III .3.1.3 Les matières en suspension (MES)

Elles représentent, la fraction constituée par l'ensemble des particules, organiques (MVS) ou minérales (MMS), non dissoutes de la pollution. Elles constituent un paramètre important qui marque bien le degré de pollution d'un effluent urbain ou même industriel. Les MES s'expriment par la relation suivante :

MES = 30% MMS + 70% MVS

- *Les matières volatiles en suspension (MVS)*

Elles représentent la fraction organique des MES et sont obtenues par calcination de ces MES à 525°C pendant 2 heures. La différence de poids entre les MES à 105°C et les MES à 525°C donne la « perte au feu » et correspond à la teneur en MVS en (mg/l) d'une eau ;

- *Les matières minérales (MMS)*

Elles représentent le résultat d'une évaporation totale de l'eau, c'est-à-dire son « Extrait sec » constitué à la fois par les matières en suspension et les matières solubles telles que les chlorures, les phosphates, etc.

L'abondance des matières minérales en suspension dans l'eau augmente la turbidité, réduit la luminosité et par ce fait abaisse la productivité d'un cours d'eau, entrainant ainsi une chute en oxygène dissous et freinant les phénomènes photosynthétiques. Ce phénomène peut être accéléré par la présence d'une forte proportion de matières organiques consommatrices d'oxygène (Duguet et al, 2006) [49].

III .3.1.4 La conductivité électrique (CE)

La conductivité est la propriété que possède une eau à favoriser le passage d'un Courant électrique. Elle fournit une indication précise sur la teneur en sels dissous (salinité de l'eau). La conductivité s'exprime en micro Siemens par centimètre et elle est l'inverse de la résistivité qui s'exprime en ohm par centimètre. La mesure de la conductivité permet d'évaluer la minéralisation globale de l'eau (REJSEK, 2002). Sa mesure est utile car au-delà de la valeur limite de la salinité correspondant à une conductivité de 2500 µSm/cm, la prolifération de microorganismes peut être réduite

d'où une baisse du rendement épuratoire [49].

III .3.1.5 La demande biochimique en oxygène (DBO_5)

La DBO_5 comme étant la quantité d'oxygène consommée par les bactéries, à 20°C à l'obscurité et pendant 5 jours d'incubation d'un échantillon préalablement ensemencé, temps qui assure l'oxydation biologique d'une fraction de matière organique carbonée. Ce paramètre mesure la quantité d'oxygène nécessaire à la destruction des matières organiques grâce aux phénomènes d'oxydation par voie aérobie. Pour la mesurer, on prend comme référence la quantité d'oxygène consommée au bout de 5 jours ; c'est la DBO_5 [49]. Elle se résume à la réaction chimique suivante :

Substrat + micro organisme + O_2 $\rightarrow$ CO_2 + H_2O + énergie + biomasse

III .3.1.6 La demande chimique en oxygène (DCO)

La Demande Chimique en Oxygène (DCO) est la mesure de la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation chimique de toute la matière organique biodégradable ou non contenue dans les eaux à l'aide du bichromate de potassium à 150°C. Elle est exprimée en mg O_2/l. La valeur du rapport DCO/DBO indique le coefficient de biodégradabilité d'un effluent, il permet aussi de définir son origine (Suschka. J et Ferreira. E, 1986) [49]. Généralement la valeur de la DCO est :

DCO = 1.5 à 2 fois DBO Pour les eaux usées urbaines ;

DCO = 1 à 10 fois DBO Pour tout l'ensemble des eaux résiduaires ;

DCO > 2.5 fois DBO Pour les eaux usées industrielles.

La relation empirique de la matière organique (MO) en fonction de la DBO_5 et la DCO est donnée par l'équation suivante :

$$MO = (2\ DBO5 + DCO)/3$$

III .4 Principe de l'épuration biologique

En théorie, toutes les réactions biologiques intervenant dans les eaux naturelles au cours des cycles du carbone, de l'azote, du phosphore, du soufre,… peuvent être transposées dans la pratique industrielle du traitement de l'eau.

Le métabolisme de certains groupes bactériens peut être mis à profit pour éliminer des molécules ou ions indésirables dans l'eau, comme les composés azotés, le fer, le manganèse ou la matière organique.

Les bactéries responsables de ces réactions biochimiques opèrent dans des limites de pH et de température qui leur sont spécifiques. Elles décomposent de façon biochimique par oxydation les matières non séparables par décantation qui n'ont pas pu être éliminées par des procédés mécaniques des eaux usées. En même temps une nouvelle substance cellulaire se forme [49].

Le taux de conversion de la matière organique en biomasse est variable selon la biodégradabilité et la quantité d'oxygène disponible.

Les phases classiques de développement des populations bactériennes sont observées :

- Phase de latence (adaptation) ;
- Phase de croissance exponentielle (diminution rapide de la DBO) ;
- Phase de ralentissement des synthèses cellulaires ;
- Phase stationnaire (Champiat et J.P. Lapart, 1994).

Tous les traitements des eaux usées résiduaires urbaines sont basés sur le principe de l'épuration biologique. Elle consiste à reproduire et à intensifier les processus existants dans la nature : lorsque, dans un milieu naturel, il y a de la matière organique, les bactéries se chargent de la dégrader et de la réduire en

Éléments simples tout en augmentant leur biomasse. Ce développement bactérien peut être naturel, ou intensifié, accéléré par des apports supplémentaires de microorganismes et/ou d'oxygène (Miquel, 2003).Le traitement s'effectue dans un réacteur où l'on met en contact des microorganismes épurateurs et l'eau à épurer [49].

III .5 Les procédés de traitements des eaux usées

Selon le degré d'élimination de la pollution et les procédés mis en œuvre, plusieurs niveaux de traitements sont définis : les prétraitements, le traitement primaire et le traitement secondaire. Dans certains cas, des traitements tertiaires sont nécessaires, notamment lorsque l'eau épurée doit être rejetée en milieu particulièrement sensible [49].

Une station d'épuration comporte généralement une phase de prétraitement, pendant laquelle les éléments les plus grossiers sont éliminés par dégrillage (pour les solides de grandes tailles), puis par flottaison/décantation (pour les sables et les graisses). Vient ensuite un traitement dit primaire, une décantation plus longue, pour éliminer une partie des MES. Des traitements physico-chimiques et/ou biologiques sont ensuite appliqués afin d'éliminer la matière organique. Ils sont généralement suivis d'une phase de clarification qui est encore une décantation.

Enfin, un traitement des nitrates et des phosphates est exigé en fonction de la Sensibilité du milieu récepteur. Il existe également des traitements dits extensifs, comme le lagunage, qui combinent des traitements biologiques, physiques et naturels [49].

Chapitre IV :
Matériels et méthodes



IV .1 Introduction :

Notre travail repose d'une part sur la production d'un biosurfactant par les souches bactériennes thermophiles isolés, et étudier leurs caractérisations qualitative et quantitative, tels que la chromatographie liquide à haute performance HPLC et la spectrophotométrie FTIR, et l'activité antimicrobienne.

D'autre part notre étude porte sur la méthode de dépollution biologique par les souches et les biosurfactants produits sur les eaux usées pharmaceutiques en Déterminant les paramètres de la dépollution pour la connaissance de l'efficacité biologiques.

Partie A :

IV.2 Production et caractérisation du biosurfactant :

IV.2 .1 Matériels et produits utilités :

IV.2.1.1 Matériels utilisés :

Les matériels utilisés pour la mesure et la production au niveau du laboratoire sont présentés dans un tableau (annexe 1).

IV.2.2.2 Produits utilisés :

- **Microbiologiques :**

Les Microorganismes utilisée sont des souches bactériennes aérobie thermophiles isolées d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures de la région de Hassi-Messaoud au sud de l'Algérie : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus(A)* et *Bacilus atrophaeus(B),* elles ont été maintenues d'après le repiquage qui se fait par la culture des bactéries dans des boites de pétri contenant de la gélose nutritif à 37C° pendant 24h [57], elles sont récultivées chaque mois et conservés à (4C°) (Figure IV.1) et (Figure IV.2).



Figure IV.1 : la souche bactérienne(A)

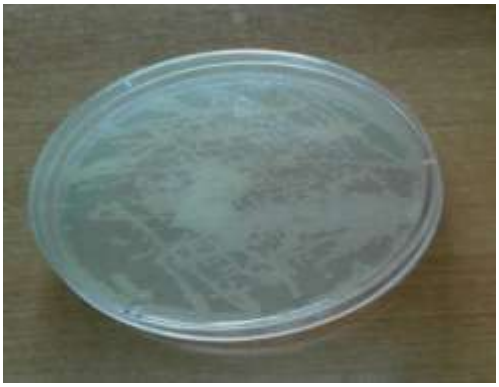


Figure IV.2: la souche bactrienne(B)

- **Autres produit :**

La liste des matières de la nature chimique utilisée pour la production sont présentés dans l'annexe 2 les matières sont décrites par leurs structures chimiques .leurs degrés de pureté ainsi que leurs origines.

IV.2.2 La méthode de production de biosurfactant :

IV.2.2.1 Préparation de l'inoculum :

Pour la préparation de l'inoculum, 50ml d'une préculture a été utilisé avec une concentration de 8g/l et pH6.8±0.2, elle contient en g/l :

- Extrait de carne …….. 3.
- Peptone de gélatine……..5.

La souche bactérienne est introduite dans erlenmeyer de 250ml après la stérilisation (à 121C°pendant 20min), dont elle croit dans ce milieu pendant 24hà 45°Dans l'incubateur [58].



Figue IV .3: la préculture de la souche A et B.

IV.2.2.2 milieu de production :

A- Préparation de solution oligoélément :

Il se prépare dans une fiole de 100 ml qui contient en (mg/l) :($ZnSO_4$, 7H2O (525) ; MnSO4, 5H2O (200) ; $NiSO_4$, 6H2O (27) ; $COCl_2$, 6H2O (200) ; H_3BO_3 (15)).

B- préparation de milieu de culture :

Il se produit dans des erlenmeyers de 250ml contenant 50ml de (Na_2HPO_4 (2.2) ; MgSO4, 7H2O ; NaCl (0.05) ; CaCl2 (0.02) ; KH_2PO_4 (1.4) ; $FeSO_4$, H2O (0.01);



Figure IV.4:la solution oligelement préparé



Figure IV .5: préparation milieu de culture

On ajoute 1ml de la solution d'oligoélément dans le milieu de culture, ils sont stérilisé pendant 20 min, ils sont incubés après le refroidissement pendant 48h sur un agitateur orbitale à 45C°et à 200 tr/ min après l'ajout de NH_4Cl (0.02g/l), le gasoil (2%) pour la souche A et (4%) de pétrole pour la souche B ainsi que 4ml de préculture [58].



Figure IV.6 : Incubation de milieu de production.

C: Extraction de biosurfactant :

Après avoir séparé la biomasse et la par centrifugation à6000/min, le liquide récupéré est précipité par l'acétone ,cette opération a été effectuée par le dosage de trois volumes d'acétone goutte à goutte sur un volume de surnageant déposé sous agitation avec l'utilisation de la glace à 4C°,le mélange homogène (surnageant –acétone) est met dans le réfrigérateur pendant 24h ,puis il est centrifugé à 200tr/min. le solide récupéré a été séché dans l'étuve à 37°C après 48h , la poudre obtenue par la suit c'est le biosurfactant .



Figure IV.7: extraction de biosurfactant par l'acétone .

IV.2.3 La caractérisation des biosurfactants :

IV.2.3.1 Spectrophotométrie infrarouge IR :

- **Principe :**

Les techniques de spectrophotométrie infrarouge sont utiliseés pour la détermination des groupement fonctionnels permettant de proposer la structure, chaque liaison présente des vibrations caractéristiques de fréquence bien déterminеé [59].

Les groupement moléculaire possèdent un certain nombre de modes de vibration caractéristiques qui sont déterminés par les masses des atomes constituant les forces interatomiques et la géométrie des arrangements, c'est-à-dire la structure. Les vibrations modifient le moment électrique dipolaire, ce qui entraine l'absorption des ondes électromagnétiques dans la région 1 à 100 µm qui correspondent au domaine de la spectrographie infrarouge [60].



Figure IV.8 : les équipements d'infrarouge IR.

IV .2.3.2 La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

- **principe :**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme[61]

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire. Ce principe est traduit par le schéma suivant :

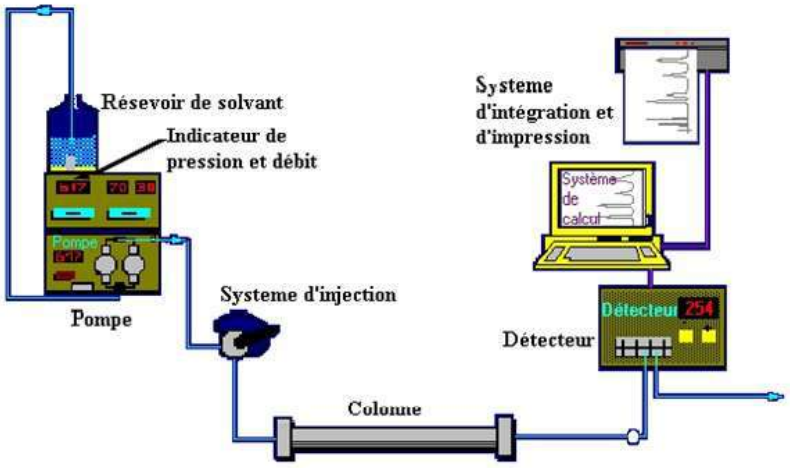


Figure IV. 9: Principe de fonctionnement d'une chaine HPLC.

Appareillage :

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux).



Figure IV.10 : les équipements de HPLC.

IV.2.3.3 l'activité antimicrobienne :

On a testé l'effet antimicrobien de 2 produits synthétisés, sur l'*Escherichia coli* (Bacille Gram-négatif), *Staphylococcus aureus* (Coccie Gram-positif).

On dissous 0.01g de biosurfactant dans 5ml d'eau distilleé et on immérge le disque dans la solution obtenue.

On prend deux colonies de chaque souches pathogènes et on met dans 5 ml d'eau distilleé. On Mesure l'absorbance des solutions à la longueur d'onde (600-620) entre (0.01et 0.08), En fait l'ensemensement des solutions dans la gélose. Les disques contenant les différentes solutions ont été placés directement au milieu de la gélose. Les durées et les températures d'incubation ont été de 24 heures et 37 ˚C. Les activités antibactériennes ont ensuite été évaluées par la mesure du diamètre des zones d'inhibition [62] .

Partie B :

IV.3 Méthodes de la dépollution de l'eau usée pharmaceutique :

IV.3.1 Les eaux usées pharmaceutiques :

Sont des eaux polluées, elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des micropolluants organiques, Elles constituent de nombreuses substances chimiques, sous forme solides ou dissoutes.

Notre étude se fait sur une eau usée pharmaceutique d'entreprise galaxo smith kline (gsK) la zone industrielle de boudouaou boumerdes.



Figure IV.11 : La station des eaux usées pharmaceutiques.

IV .3 .2Le traitement par les souches bactriennes :

IV .3.2.1 La production de milieu LB :

On introduit dans un erlenmmeyer de 250ml, NaCl (0.5) ; extrait de levure (0.5) ; peptone (1) en (g/l), dans 100 d'eau distillée ml, stérilisé à 121C° pendant 15min.



Figure IV.12 : le milieu LB.

- **Mode opératoire :**

- Utilisation d'une quantité d'espèce bactrienne, mettre dans le milieu LB de 100ml.
- ils sont incubés pendant 48h sur un agitateur orbital à 45°C et à150 tr/min.
- le prélèvement de 3% de trouble après sa formulation.
- Mettre le trouble à 500ml de rejet liquide (eaux usées), et incubé pendant 24h à 45C° et à150 tr/min
- chaque prélèvement doit être mesuré chaque 24h pendant 5 jours.



Figure IV.13 : Représentation de l'incubateur shaker.

IV.3.3 traitement par les biosurfactant :

- **Mode opératoire :**

- on pèse 0.01g de biosurfactant, et on dissous dans 5ml d'eaux distillé, on met dans 500 ml de rejet liquide (eaux usées industrielles).
- Incubé pendant 24h à 45°C et à 150 tr/min.
- chaque prélèvement doit être mesuré chaque 24h pendant 5 jours

IV. 4 les méthodes d'analyses :

IV.4.1 Détermination du pH :

IV.4.1.1 Principe :

Le présent document spécifie la méthode de mesure du pH des eaux par une méthode potentiométrique avec une électrode de verre.

La méthode est applicable dans le cas de mesures effectuées sur des eaux dont la température est comprise entre 0°C et 60°C, elle est applicable aux eaux de pH compris entre 3 et 10 [63].

IV.4.1.2 Appareillage :

- ✓ Electrode de verre
- ✓ Electrode de référence
- ✓ Dispositif potentiométrique, adapté à la mesure du Ph

IV.4.1.3 Echantillonnage :

Il est recommandé de déterminer le pH des eaux in situ, de la façon à ne pas modifier les équilibres ioniques par suite d'un transport ou d'un séjour plus ou moins prolongé des échantillons dans des flacons.

IV.4.1.4 Mesurage des échantillons :

Dans le cas d'échantillons d'eaux peu tamponnée, ou dont la composition est susceptible de se modifier au contact de l'air, le pH doit être déterminé en minimisant les échanges avec l'air.

Effectuer la mesure du Ph de l'échantillon sous agitation modérée.



Figure IV.14 : le pH mètre.

IV.4.2 La conductivité :

La conductivité électrique est mesurée pour l'échantillon de l'eau usée, Après le rinçage de la soude du conductimètre (cond 7310) on le plonge dans le flacon qui contient l'échantillon à analyser.

On agite le flacon d'échantillon afin que la concentration ionique entre les électrodes soit identique à celle du liquide ambiant, on lit la valeur de conductivité sur l'appareille.



Figure IV.15: la conductivité mètre.

IV.4.3 Dosage des matières en suspensions MES

IV.4.3.1 principe

Le présent document décret une méthode de dosage des matières en suspension dans les eaux brutes les eaux usées et les effluents, par filtration sur filtre en fibres de verre. La limite inférieur de dosage est d'environ 2mg /l, aucune limite supérieure n'a été fixé.

IV.4.3.2 Appareillage

Equipement de filtration sous vide ou sous pression

- Filtre en fibres de verre borosilicaté
- Etuve
- Balance analytique
- Support de séchage ayant un matériau de surface



Figure IV.16 : représentation d'équipement matière en suspension.

- **Mode opératoire :**

- Laisser les échantillons s'équilibrer à température ambiante.

- Laisser les filtres s'équilibrer à température ambiante à approximation de la balance, éviter soigneusement de contaminer le filtre par des poussières, par exemple en utilisant un dessiccateur.

- Placer le filtre (la partie lisse en bas) dans l'entonnoir du dispositif de filtration, et connecter à un dispositif d'aspiration sous vide.

- Agiter vigoureusement le flacon transférer immédiatement et d'un trait un volume convenable d'échantillon dans une éprouvette graduée.

- Filtrer l'échantillon, puis rincer l'éprouvette graduée avec environ 20ml d'eau distillée, et utiliser cette portion pour laver le filtre, rincer les parois internes de l'entonnoir avec un autre volume de 20ml d'eau distillée [64].

IV.4.3.3 Calcul :

Calculer la teneur en matière en suspension d'après l'expression :

$$\rho = 1000 \times (b - a)/\text{v} \quad \text{.....Eqt (1)}$$

ρ : est la teneur en matières en suspension en mg/l

b : est la masse du filtre après filtration en mg.

a : est la masse du filtre avant filtration en mg.

V : est le volume de l'échantillon, en ml. Si l'échantillon a été pesé, 1g est considéré comme équivalent à 1ml.

IV.4.4 La demande chimique en oxygène DCO :

VI.4.4.1 principe :

Dans les conditions définies, certaines matières contenues dans l'eau sont oxydées par un excès de dichromate de potassium en milieu acide et en présence de sulfate d'argent et de sulfate de mercure, l'excès de dichromate de potassium est dosé par le sulfate de fer et d'ammonium [65].

- ✓ **Réactifs :**

Les préparations chimiques des réactifs de la DCO utilisées sont présentées dans (annexe 3) ils sont décrites par leurs structures chimiques.et leurs concentrations.



Figure IV.17: le montage de DCO.

- ➢ **Mode opératoire :**

- Transvaser 10ml de l'échantillon pour analyse, diluer si nécessaire dans un tube à DCO mètre (Toujours le volume total est de 10ml).
- Mettre 10ml d'eau distillé dans un tube à DCO mètre (c'est le blanc) (effectuer 2 essais à blanc).
- Mettre 10ml d'hydrogenophtalate de potassium dans un tube à DCO mètre (c'est le témoin)
- Ajouter pour chaque tube 5ml de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) et quelque bille en verre (Régulation d'ébullition) et agiter soigneusement.
- Ajouter lentement 15ml d'acide sulfurique et le sulfate d'argent sous la hotte.
- Mettre le DCO en marche à une température 150°C pendant 120 min.
- Une fois les 120 min entame, éteindre le DCO mètre et laisser les tubes refroidir.
- Diluer le contenu de chaque tube dans une éprouvette de 100ml à environ 75 ml.
- Mettre 1 à 2 gouttes de l'indicateur ferroine, et titrer avec la solution sulfate de fer et d'ammonium (sel de mohr).

IV.4.4.2 Expression des résultats :

La DCO, exprimée en milligramme par litre, est donnée par la formule :

$$DCO = 8000*C\ (V1-V2)/V0$$

C : est la concentration en quantité de matière, exprimé en moles par litre, de la solution de sulfate de Fer et d'ammonium, donné par la formule 10*0.04*6/V.

V0 : est le volume en millilitres de la prise d'essai avant dilution.

V_1 : est le volume en millilitres de la solution de sulfate de fer et d'ammonium utilise pour l'essai à blanc.

V_2 : est le volume en millimètres de la solution de sulfate de fer et d'Ammonium utilise pour

L'échantillon.

8000 : est la masse molaire en milligrammes par litre de O_2.

IV.4.5 : spectrophotométrie UV-Visible :

IV.4.5.1 Principe :

Le spectrophotomètre est un appareil permettant de mesurer l'absorbance d'une solution, pour différentes longueurs d'ondes .pour cela, il faut passer un rayon d'une longueur d'onde choisie à travers une cuve contenant la solution à étudier (figure IV .19) .les molécules de solution absorbent plus ou moins le rayons lumineux on définit alors l'absorbance pour cette longueur d'onde [66].



Figure IV.18 : le spectrophoto mètre.

Chapitre V :
Résultat et discussion



V.1 Production de biosurfactant :

Le biosurfactant à été produit par la souche bactérienne *marinobacter hydrocarbonoclasticus,* ainsi KANOKRAT en 2013 [67], à produit un tensioactif à partir de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* isolée à partir de l'eau résiduaire autour des palmiers. En plus nous avons produit un autre biosurfactant à partir de la *Bacillus atrophaeus.* Plusieurs auteurs ont pu produire des biosurfactants en utilisant des souches bactériennes *Bacillus atrophaeus* isolée du sol contaminé par les hydrocarbures tel que Junhui Zhang et al (2016) [68].

V.1.1 Extraction de biosurfactant :

Le biosurfactant obtenu par la méthode d'extraction à 4°C est une poudre blanche cristalline soluble dans l'eau distillée.

- La quantité de biosurfactant A (nous avons utilisé dans ce cas la souche bactérienne *marinobacter hydrocarbonoclasticus*) égale à 0,393g.



Figure V.1: La poudre de biosurfactant A.

- La quantité de biosurfactant B (nous avons utilisé dans ce cas la souche bactérienne *Bacillus atrophaeus*) égale à 0,291g.



Figure V.2: La poudre de biosurfactant B.

V.1.2 Caractérisation des biosurfactants :

V.1.2.1 Spectre infrarouge

Le spectre IR du biosurfactant solide à été mesuré à l'aide d'un Spectrophotomètre BRUKER entre 500 et 4000 cm^{-1}.

Le spectre donne l'absorbance (A) en fonction du nombre d'onde.

- Pour le produit A :

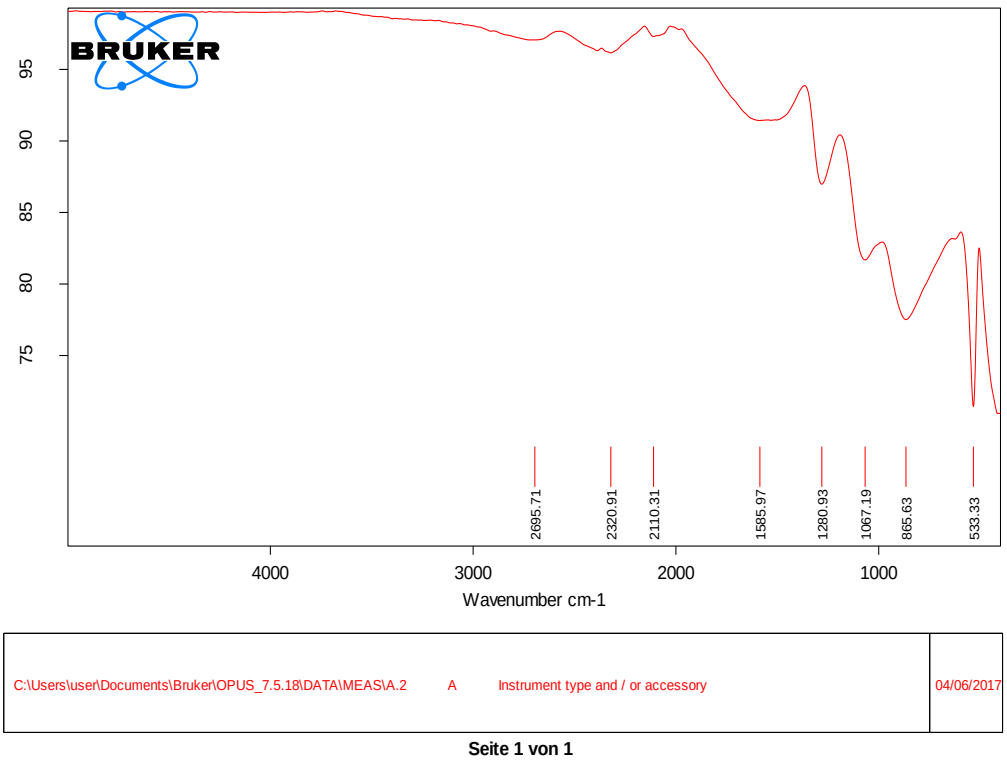


Figure V.3: Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche *marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Les pics détectés par le spectrophotomètre infrarouge de transformée de Fourrier sont résumés dans le tableau V.1 :

Tableau V.1 : Groupements caractéristiques du biosurfactant A.

Nombre d'onde	Groupement
1585.97	C=O d'un acide carboxylique
1280.93	Méthyle (CH_3)
1067.19	C-O des esters
886.63	C-H
600.00	$(CH2)_n$ $n \geq 4$
2829	$-CH_3$ ou $-CH_2$ d'un alcane

- Pour le produit B :

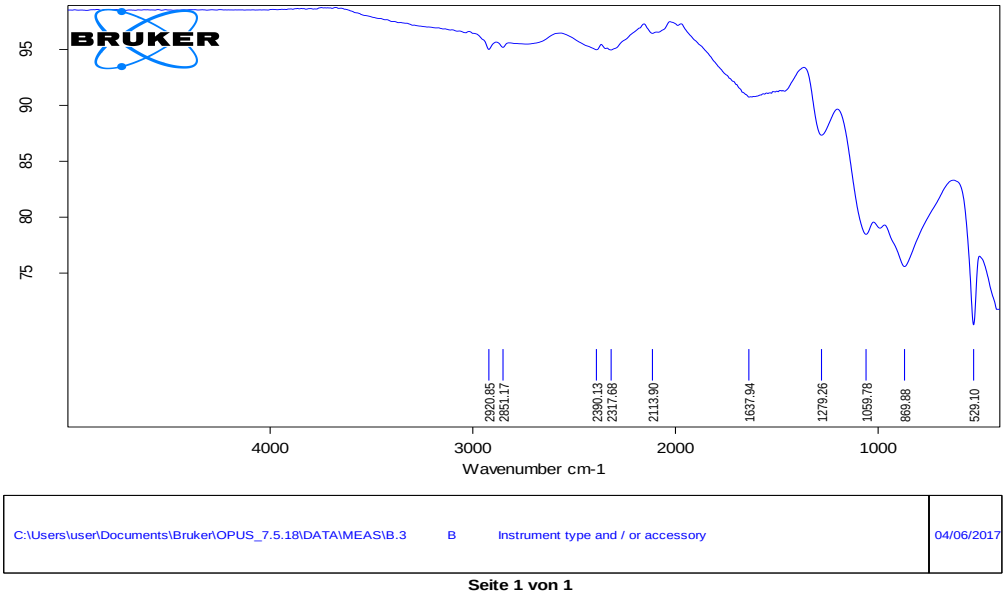


Figure V .4 : Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche *Bacillus Atrophaeus.*

Tableau V.2 : Groupements caractéristiques du biosurfactant B.

Nombre d'onde	Groupement
1279.26	Méthyle (CH_3)
1059.78	C-O des esters
869.88	C-H
529.10	$(CH2)_n$ $n \geq 4$

Le pic d'adsorption présent à 2829 cm^{-1} sur la figure est celui de la vibration de valence C-H des chaines hydrocarbonées, sachant que toutes les classes de biosurfactants en contiennent

Le groupe carbonyle d'ester a également apparu à 1067.19 cm^{-1}, qui correspond aux vibrations de déformation C-O sur la figure V.2. Confirmant ce que DESAI et BANAT (1997) [69], Ron et Rosenberg (2001) [70] ont prouvé que presque tous les biosurfactants ont un groupement ester ou acide carboxylique dans leurs structures.

Les types de biosurfactants produits dépendent de la souche bactérienne, de la source de carbone utilisée et le processus de production [71].

- **Effet anti microbien**

Les suspensions des espèces bactériennes: *Staphylococcus sp*, on été étale sur l'agar.

Un disque stérile immergé dans une solution de biosurfactant jusqu'a la saturation à été déposé sur la surface de cet agar qui est incubé a 37°C pendant 24h.

Après l'incubation de 24h, on peut remarquer l'apparition des diamètres du halo d'inhibition entourant les disques pour les souches bactériennes.

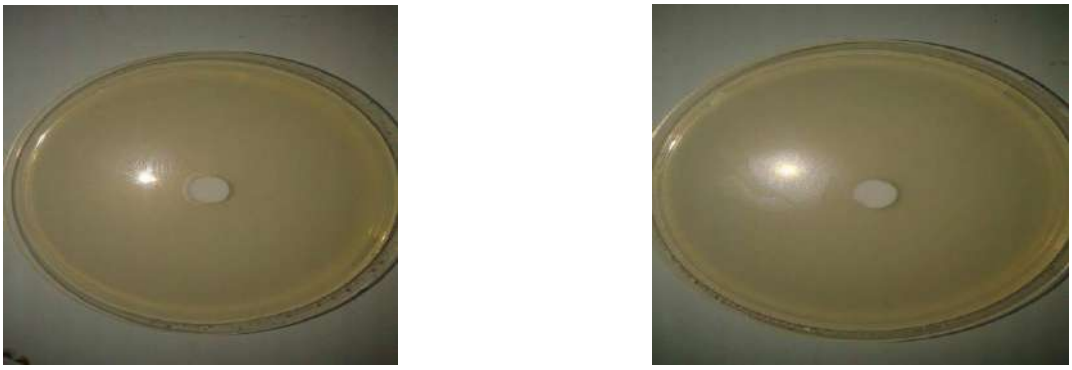


Figure V.5 : l'activité antimicrobienne des produits A et B sur *Escherichia coli.*

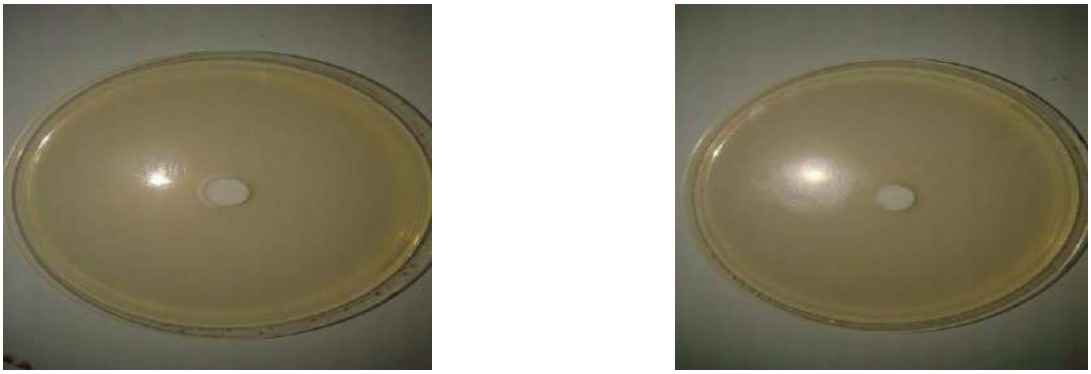


Figure V.6 : Activité antimicrobienne des produits A et B sur *Staphylococcus aureus*.

Tableau V.3 : valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) de différents produits synthétisés sur la croissance d'Escherichia *coli* et *Staphylococcus aureus*

	Activité sur *Escherichia coli*		**Activité sur *Staphylococcus aureus***	
produits	**A**	**B**	**A**	**B**
Zone d'inhibition (mm)	1.3	–	1.2	1.1

– : pas de zone d'inhibition observée au tour du disque.

Les antibiogrammes réalisés sur les espèces d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* montrent le pouvoir inhibiteur des biosurfactants produits par *marinobacter hydrocarbonoclasticus* et *Bacillus atrophaeus* seulement où il apparaît une zone claire autour du disque figure V.5 et V.6 qui signifie l'absence de croissance dans cette zone à cause de la diffusion des molécules du biosurfactant.

C'est une méthode microbiologique qui permet de détecter le pouvoir d'une substance chimique à inhiber la croissance bactérienne de certains microorganismes et celui par dissolution de la paroi cytoplasmique de ces derniers, Ainsi, le biosurfactant A montre encore une activité antimicrobienne [72]. contre les espèces *Escherichia coli et Staphylococcus aureus*, ceci est dû aux interactions avec la membrane lipidique, mais le biosurfactant B montre une activité antimicrobienne contre l'espèce *Staphylococcus aureus* seulement.

❖ **HPLC**

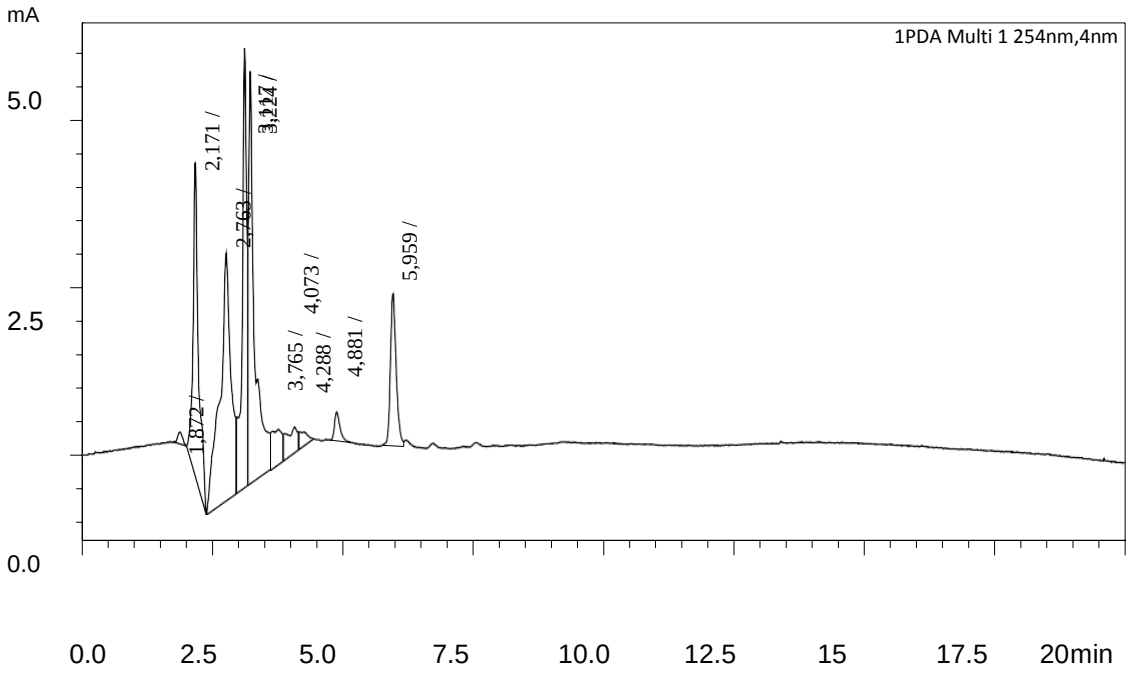


Figure V.7 : HPLC Chromatogramme de biosurfactant A.

D'après le chromatogramme obtenu (Figure V.10), le biosurfactant produit par la souche bactérienne *marinobacter hydrocarbonoclasticus* constitue un mélange de plusieurs biosurfactants.

D'autres travaux ont montré que le produit obtenu est un mélange de rhamnolipides synthétisés par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* [73].

V.2. Dépollution d'un rejet :

V.2.1.Caractérisation d'eaux useès pharmaceutique :

V.2.1.1. Déterminations des paramètres physico chimiques de rejet avant la dépollution :

Tableau V.4 : Déterminations des paramètres physico chimiques.

Les paramètres	La température C°	La conductivité Ms / cm	Le pH
L'échantillon	23.4	948	7.45

Tableau V.5 : La détermination de MES.

Filtration RéF :NFEN 872	**Contrôle de la solution**	**VE (ml)**	**Masse du filtre avant Filtration M_0 (g)**	**Masse du filtre après filtration et séchage M_1(g)**	**MES (g/l)**	**Résidu compris ente [5mg-50mg]**
		200	2.7054	2.7350	0.148	29.6

Tableau V.6 : La détermination de DCO avant la dépollution.

Contrôle du titre		**Contrôle du blanc**		
V titre ml	**C**	**Vb_1**	**Vb_2**	**Moyenne Vb (ml)**
10	0.12	10	9.8	9.9
V titre ml	**DCO**			
8.1	172.8			

- **La détermination de DO :**

Par la spectrophotométrie UV-Visible en détecté la valeur de l'absorbance

DO=0.340

V.2.1.2. traitement d'épuration par la souche :

V.2.1.2.1.La souche *marinobacter hydrocarbonoclasticus* :

- **DO**

Tableau V.7 :la variation d'absorbance (rejet +souche A) pendant 5 jours.

jours(h)	**0**	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
Abs	0.340	0.320	0.270	0.221	0.157	0.115

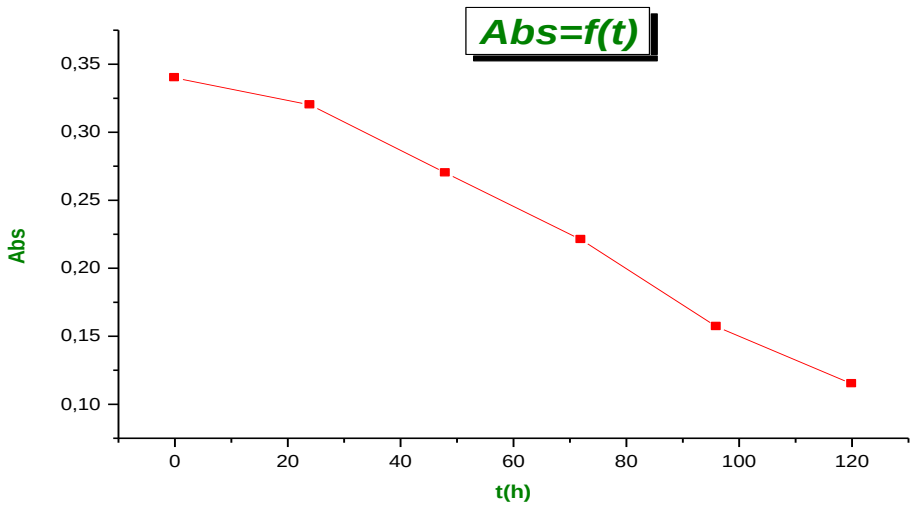


Figure V.8 : la variation de l'absorbance (rejet +souche A) en fonction du temps.

- Évolution de la demande chimique en oxygène **DCO**

Tableau V.8 :la variation de la DCO (rejet +souche A) pendans les 5 jours.

jours (h)	**0**	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
DCO(mg/l)	172.8	163.2	144	124.8	86.4	76.8

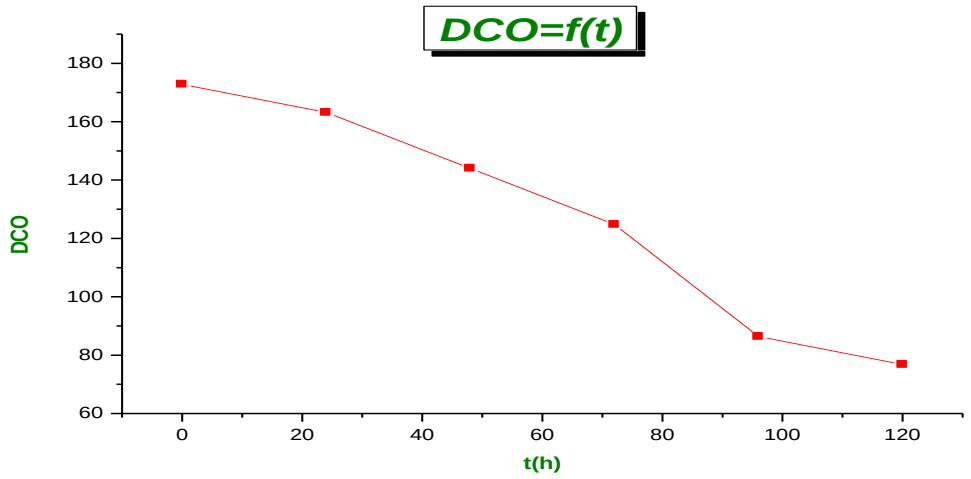


Figure V.9 : la variation de la DCO (rejet +souche A) en fonction du jour.

V.2.1.2.2. la souche *Bacillus atrophaeus* :

- **DO**

Tableau V.9 : la variation d'absorbance de (rejet +souche B) pendant 5jours.

Jours (h)	**0**	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
Abs	0.340	0.264	0.197	0.173	0.148	0.109

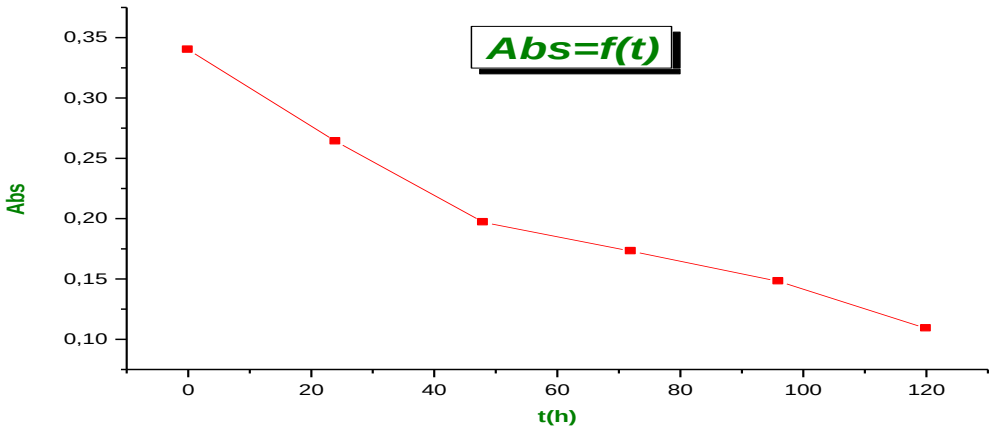


Figure V.10 : la variation de l'absorbance (rejet +souche B) en fonction du jour.

- Évolution de la demande chimique en oxygène **DCO**

Tableau V.10 :la variation de la DCO du (rejet+souche B) pendant les 5 jours.

jours (h)	**0**	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
DCO	172.8	153.6	134.4	115.2	105.6	67.2

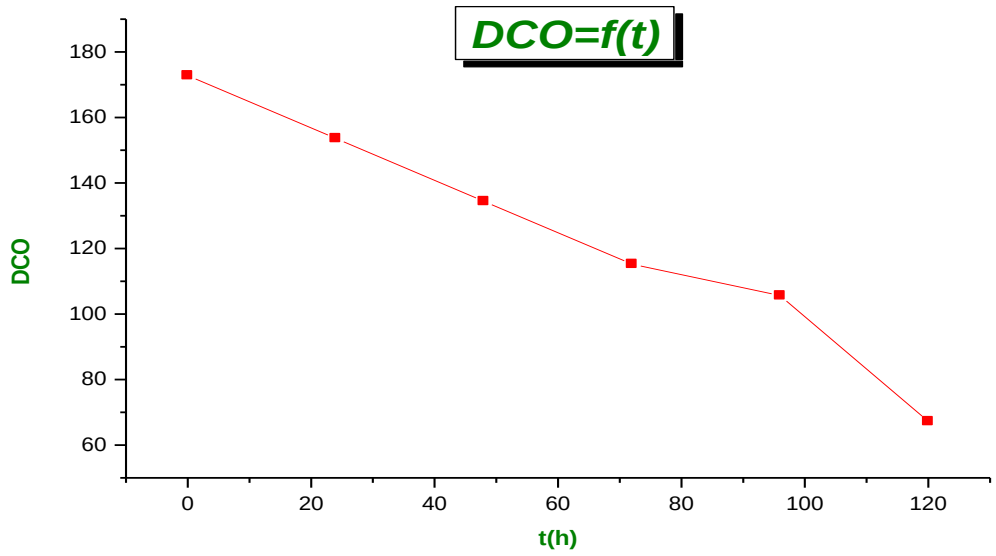


Figure V.11 : la variation de la DCO du (rejet +souche B) en fonction du jour.

➢ Nous observons une diminution significative de la DCO et DO au cours du traitement en fonction du temps par les deux souches.
La diminution de DCO nous montre que les souches éliminent le polluant.

V.2.1.3. traitement d'épuration par Biosurfactant :

V.2.1.3.1.Biosurfactant A :

- **DO**

Tableau V.11 :la variation d'absorbance du (rejet +biosurfactant A).

Jours(h)	**0**	**24**	**48**	**27**	**96**	**120**
Abs	0.340	0.174	0.120	0.067	0.033	0.019

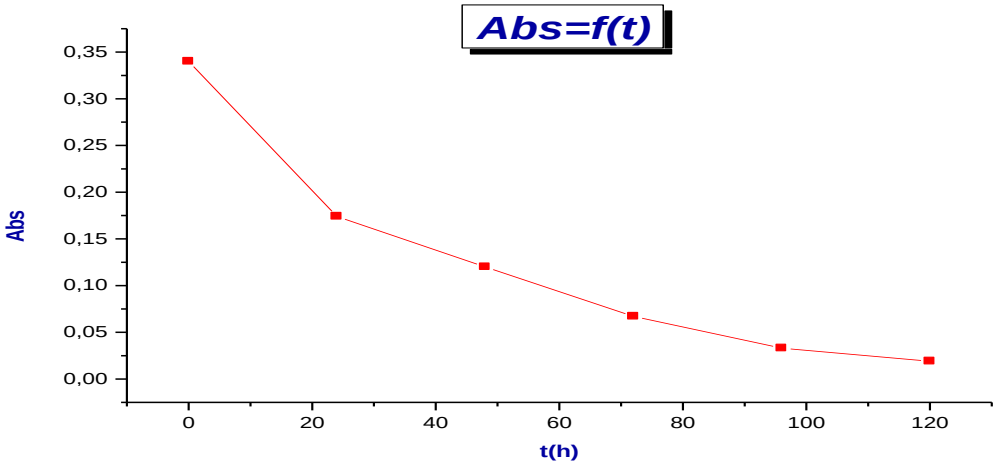
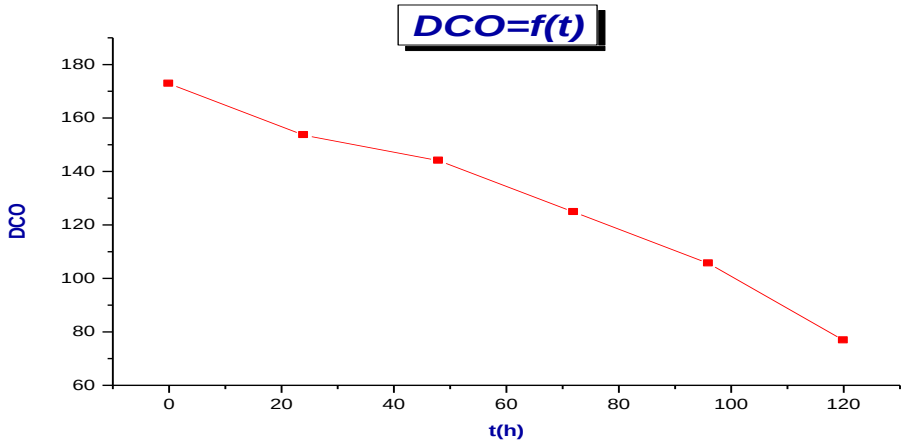


Figure V.12 : la variation de l'absorbance du (rejet +biosurfactant A) du temps.

- Évolution de la demande chimique en oxygène **DCO**

Tableau V.12 : la variation de la DCO du (rejet +biosurfactant A) pendant 5jours.

Jours (h)	**0**	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
DCO mg/l	172.8	153.6	144	124.8	105.6	76.8



FigureV.13 :la variation de la DCO du (rejet +biosurfactant A) en fonction du temps.

V.2.1.3.2. Biosurfactant B :

- **DO**

Tableau V.13 : la variation d'absorbance du (rejet +biosurfactant) pendant 5jours.

jours (h)	**0**	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
Abs	0.340	0.174	0.120	0.067	0.033	0.019

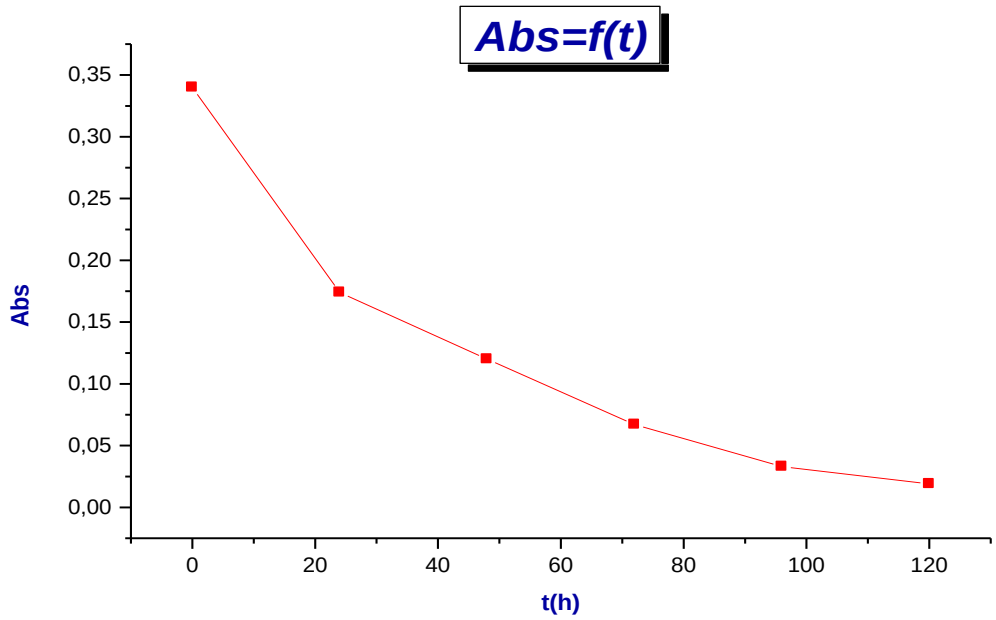


Figure V.14 : la variation d'absorbance du (rejet +biosurfactant B) en fonction du temps.

- Évolution de la demande chimique en oxygène **DCO**

Tableau V.14 : la variation de DCO du (rejet +biosurfactant) pendant 5jours.

Jours (h)	**0**	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
DCO	172.8	144	115.2	96	67.2	48

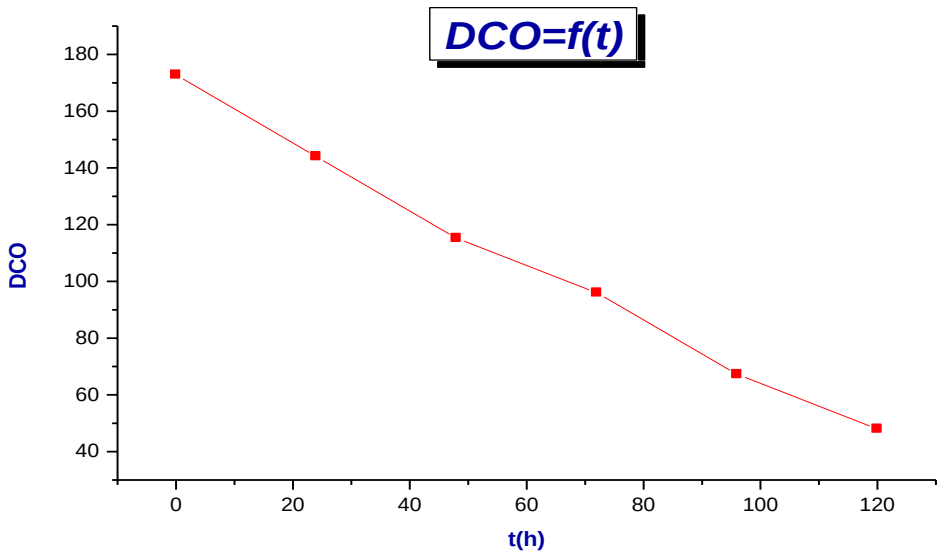


Figure V.15 : la variation de la DCO (rejet +biosurfactant B) en fonction du temps.

- Nous observons une diminution significative de la DCO et DO au cours du traitement en fonction du temps par les deux biosurfactants.
  La diminution de DCO nous montre que les biosurfactants éliminent le polluant.

- D'après nos résultats de DCO et en comparaison avec d'autres résultats [49] on a trouvé qu'il y a une dépollution de rejet utilisé.
  Mais on constate que la dépollution avec les souches mieux que avec les biosurfactants.

Conclusion générale



Conclusion générale

Cette étude, qui s'inscrit dans le cadre général de la dépollution de l'eau usée pharmaceutique par les souches bactériennes thermophiles isoles à partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région Hassi-Messaoud d'Algérie (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus) (Bacilus atrophaeus)* , sont efficaces pour l'élimination des constituants polluants avec une bonne dégradation de la pollution.

L'intérêt est porté en premier lieu à la production de deux biosurfactants à partir des deux souches bactériennes thermophiles. Les rendements obtenues par l'extractions était de 0.4 et 0,3 g. la caractérisation par analyse spectroscopique infra rouge, à montré que les deux produits comportaient des groupements carbonyles et des méthyles. La chromatographie liquide à haute performance HPLC à montré que L'un des deux tensioactifs est un mélange de plusieurs constituants.
L'étude de l'activité microbienne montre le pouvoir des biotensioactifs à inhiber la croissance bactérienne de certains microorganismes.

Dans la seconde partie, en vue d'une application environnementale on a prouvé que les souches bactériennes et les deux biomolécules sont capables de traiter des rejets industriels pharmaceutiques.

Le travail présenté ici a évidemment une durée limitée et est loin de venir à bout des problèmes envisagés. Sa prolongation devrait se porter sur les points suivants :

- L'utilisation d'autres méthodes spectrales telle que « la RMN » pour une identification précise des tensioactifs produits.
- La combinaison des techniques d'immobilisation de biosurfactants pour mieux maitriser l'application environnementale et industrielle.

Annexes

Annexe 1 : matériels utilisées

Instrument	Modèle	Origine
Etuve	D-91126 Schwa Bach FRG	Allemagne
Balance électronique	Satotius	Allemagne
Centrifugeuse	D-78532 Tuttlingen	Allemagne
Plaque chauffante agitateur	IKA-Ccombimag	Allemagne
Incubateur-agitateur	IKA-Mini MR	U.S.A
Agitateur	Shaker	Allemagne
Autoclave	/	/
spectroscopie UV-Visible Mini 1240	Shimadzu	JAPON
Ph mètre	Innov	Allemagne
Conductivité mètre	innov	Allemagne

Annexe 2 : les matières utilisées

Réatif	**Forme chimique**	**Pureté**	**Origine**
Dshydrogénase phosphate de sodium	Na_2HPO_4	98.5	Fluka
Dishydrogénase phosphate de potassium	KHO_2PO_4	98%	Reidel-de Haen
Sulfate de magnésuim hyptahydraté	$MgSO_4,7H_2O$	99%	Reidel-de Haen
Sulfate de cuivre pentahydraté	$CuSO_4,7H_2O$	98%	Sigma-Aldrich
Sulfet de fer hyptahydraté	$FeSO_4 ,7H_2O$	99%	Reidel-de Haen
Sylfate de zinc	$ZnSO_4,7H_2O$	99.5	Reidel-de Haen
Sulfete de nickel heptahydraté	$NiSO_4,6H_2O$	99%	Sigma-Aldrich
Sulfete de maganéses hydraté	$MnSO_4,7H_2O$	99%	Reidel-de Haen
Chlorure de sodium	NaCl	99.8	Nen Tech LTD
Chlorure d'ammoniac	NH_4Cl	99.8	Sigma-Aldrich
Chlorutre de sobalt hexahydraté	$CoCl_2,6H_2O$	98.8	Reidel-de Haen
Chlorures de calcium	$CaCl_2$	98%	Reidel-de Haen
Acide borique	H_3BO_3	98%	Fluka
Pérole	/	99%	kurogène
Acétine	$C3H_6O$	99%	Reidel-de Haen

Annexe 3 : les réactifs de DCO

Réactifs :

I-Dichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$: $C(K_2Cr_2O_7)=0.040$ mol/l contenant du sel de mercure.

Dissoudre **80g** de sulfate de mercure ($HgSO_4$ dans **800ml** d'eau. Ajouter Avec précaution **100ml** d'acide sulfurique pour (f =1.84 g/l). Laisser refroidir

Ensuite dissoudre **11.768g** de dichromate de potassium probablement séché à **105C°** pendant 2h, dans la solution transvaser la solution quantitativement dans une fiole jaugée et diluer à**1000ml.**

- La solution est stable pendant au moins 1 moins.

II Acide sulfirique- sulfate d'argent (acide sulfurique à préparé) :

Ajouter **10g** de sulfate d'argent ($AgSO_4$) à **35ml** d'eau.

Ajouter par portions 956ml d'acide sulfiriques pour ($f = 1.48$), la dissolution est favorisée par agitation, laisser reposer 1ou 2 jours .

Témoin : Hydrogenophatalate de potassium :

Dissoudre **0.1062g** d'Hydrogenophatalate de potassium préalablement séché à**105C°**dans de l'eau et diluer à **250ml**

La solution est stable au moins 1 semaine si elle est conservée à **4C°**.

La solution à une valeur théorique de DCO de **500mg/l**.

III sulfate de fer et d'ammonium : solution titrée

C $(NH_4)_2$ Fe $(SO_4)_2 6 H_2O$=0.12 mol /l

Dissoudre **4.7g** de sulfate de Fer et d'Ammonium dans l'eau. Ajoutre2 ml d'acide sulfurique pour (f =1.84 g/l), refroidir et diluer avec de l'eau à **100ml**.

III- 1 Acide sulfurique dilué C (H_2SO_4)=4mol/l :

Ajouter à environ **250ml** d'eau, par portion et avec précaution 110ml d'acide sulfurique pour

Laisser refroidir et diluer à **500ml.**

III-2 Ferroine : solution d'indicateur

Dissoudre **0.35g** de sulfate de fer (Fe SO_4 $7H_2O$), ou 0.5g de sulfate de Fer et d'Ammonium hexahydrate $(NH_4)_2$ $Fe(SO_4)_2$ H_2O.

Ajouter **0.75g** de phénanthroline **1.10** monohydratée C_{12} H_8 N_2H_2O, et agiter jusqu'à dissoudre. Diluer à **50ml**.

- Cette solution reste stable pendant quelques moins si elle est conservé à l'obscurité.

Annexe 4 : spectrophotométrie infrarouge IR

Dans les conditions normales de température et de pression les atomes et les groupements fonctionnels constituants le composé sont exposés à rayonnement électromagnétique

Sous l'effet d'un rayonnement électronique infrarouge, les liaisons moléculaires absorbent une partie de cette énergie et vibrent selon les mouvements de différents types (vibrations d'élongation ou de déformation).

Le domaine infrarouge, dans lequel se trouvent les énergies de vibration des liaisons moléculaires, est divisé en trois zones

- Proche infrarouge : λ=0.8 à 2.5mm (ou ν =4000 à 12500 cm^{-1}).
- Moyen infrarouge : λ=2.5 à 25 mm (ou ν = 400 à4000 cm^{-1}).
- Lointain infrarouge : λ= 25 à 1000 mm (ou ν =10 à 400cm^{-1}).

Références

Références bibliographiques

[1] https://www.aquaportail.com/definition-435-bacterie.html.

[2] Fredrickson J, Zachara J, Balkwill D, et al, **«** Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state **»**, Appl Environ Microbiol,vol. 70, n° 7, 2004, p. 4230–41.

[3] Ishige T, Honda K, Shimizu S, **«** Whole organism biocatalysis **»**, Curr Opin Chem Biol, vol. 9, n° 2, 2005, p. 174–80.

[4] http://sciencejunior.fr/biologie/les-bacteries.

[5] http://www.jpboseret.eu/biologie/index.php/microbiologie/77-anatomie-structure-bacterienne.

[6] http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers17 01/010069076.pdf.

[7] Gauthier, M. J., B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin, and J.-C. Bertrand. "Marinobacter hydrocarbonoclasticus gen. nov., sp. Nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon degrading marine bacterium." Int. J. Syst. Bacteriol., 1992, DOI: 10.1099/00207713-42-4-568.

[8] Larsen, H. **"**Halophilic and halotolerant microorganisms: an overview and historical perspectives.**"** FEMS. Microbiol. Rev., 1986, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1986.tb01835.x.

[9] Gärdes, A., Kaeppel, E., Shehzad, A., Seebah, S., Teeling, H., Yarza, P., Glöckner, **F.O., Grossart, H.P., and Ullrich, M.S**. **"**Complete genome sequence of Marinobacter adhaerens type strain (HP15), a diatom-interacting marine microorganism.**"** Stand. Genomic Sci., 2010, DOI: 10.4056/sigs.922139.

[10] Grimaud, R., Ghiglione, J.F., Cagnon, C., Lauga, B., Vaysse, P.J., Rodriguez-Blanco, A., Mangenot, S., Cruveiller, S., Barbe, V., Duran, R., Wu, L.F., Talla, E., Bonin, P., and Michotey, V. **"**Genome Sequence of the Marine Bacterium Marinobacter hydrocarbonoclasticus SP17, Which Forms Biofilms on Hydrophobic Organic Compounds**."** J Bacteriol., 2012, DOI:10.1128/JB.00500-12.

[11] Nguyen, B.H., Denner, E.B.M., Dang, T.C.H., Wanner, G., and Stan-Lotter, H. **"**Marinobacter aquaeolei sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well**."** Int. J. Syst. Bacteriol., 1999, DOI: 10.1099/00207713-49-2-367.

[12] Al-Mallah, M., Goutx, M., Mille, G., and **Bertrand, J.C**. **"**Production of emulsifying agents during growth of a marine Alteromonas in seawater with eicosane as carbon source, a solid hydrocarbon." Oil Chem. Pollut., 1990, DOI: 10.1016/S0269-8579(05)80005-X.

[13] Rehm, H.J., and Reiff, I. **"**Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes.**"** Adv. Biochem. Eng., 1981, DOI: 10.1007/3-540-10464-X_18.

[14] Hamdan, L. J. and P. A. Fulmer. "Effects of COREXIT® EC9500A on bacteria from a beach oiled by the Deepwater Horizon spill.**"** Aquat. Microb. Ecol., 2011, DOI: 10.3354/ame01482.

[15] Nakamura, L. K. 1989. Taxonomic relationship of black-pigmented Bacillus subtilis strains and a proposal for Bacillus atrophaeus sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39**:**295-300.

[16] Wedum, Arnold. "Special Report No. 185 (Declassified)" (PDF).Defense Technology Information Center. United States Chemical Corps. Retrieved 25 February 2015

[17] Gibbons, Henry; et **al**. (25 Mar 2011). "Genomic signatures of strain selection and enhancement in Bacillus atrophaeus var. globigii, a historical biowarfare simulant". PLoS ONE. **6** (3): e17836.

[18] HAYWARD, AE; MARCHETTA, JA; HUTTON, RS (July 1946). "Strain variation as a factor in the sporulating properties of the so-called Bacillus globigii.". Journal of Bacteriology. **52**: 51–4.

[19]. Burke, SA; Wright, JD; Robinson, MK; Bronk, BV; Warren, RL (May 2004). "Detection of molecular diversity in Bacillus atrophaeus by amplified fragment length polymorphism analysis.". Applied and Environmental Microbiology. 70 (5): 2786–90.

[20] Greenberg, DL; Busch, JD; Keim, P; Wagner, DM (1 September 2010). "Identifying experimental surrogates for Bacillus anthracis spores: a review." Investigative genetics. 1 (1): 4.

[21] Zhelev, DV; Hunt, M; Le, A; Dupuis, C; Ren, S; Gibbons, HS (December 2012). "Effect of the Bacillus atrophaeus subsp. globigii Spo0F H101R mutation on strain fitness.". Applied and Environmental Microbiology. 78 (24): 8601–10.

[22] GUERGOURI Ibtissem, « Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants Soutenu le **»**29 /06/2010 Université Mentouri de Constantine.

[23] Alain K., 2003. Approches Culturales Et Moléculaires Des Assemblages Microbiens Associes Aux Polychètes Hydrothermaux De La Famille Alvinellidae, Thèse de doctorat en microbiologie, Université de Bretagne Occidentale, 197p.

[24] Begon M., Harper J.L., Townsend C.R., 1996. Ecology: individuals, populations and communities. 3rd Edition. Blakwell Science Eds. Oxford. 1068 p.

[25] V. NETO; **«** Nouvelles méthodes d'élaboration de tensioactif glycosylés par métathèses croisée et cycloadition 1,3 dipolaire **»**, Thèse de doctorat, Université de LIMOGES, N° 43 - 2007.

[26] G. THOMELIN ; « Les tensioactifs dans les eaux douces et marines, Analyse, comportement, Ecotoxicologie », Université de LILLE, Repères océan (N° 9-1995).

[27] http://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/chimie-tensioactif-11288/

[28] Caroline RONDEL :< Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives>, L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE ,2009

[29] Noiret N., Benvegnu T. and Plusquellec D. (2002) Surfactants from renewable resources. Actualite Chimique. 11-12:70. **Al Sabagh A**. (2002) The relevance HLB of surfactants on the stability of asphalt emulsion. Journal of Colloid Interfaces A 204:73.

[30] http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/faq/53187-tensioactif-definition.

[31] M. Rosen, « Surfactants and Interfacial Phenomena **»**, 3rd Ed., Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2004.

[32] https://sites.google.com/site/tensioactifststan/qu-est-ce-qu-un-tensioactif.

[33] Mr: CHATERBACHE Abdelghani « étude et synthèse de composes tensioactifs a base des souches naturelles et obtention e détergents industriel», université mentouri constantine.

[34] http://www.irsst.qc.ca/media/documents/pubirsst/b-064.pdf, Département de santé environnementale et santé au travail septembre 2001 Faculté de médecine, Université de Montréal.

[35] Lynn, J.L.; Bory, B.H. (1996) Surfactant. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology (Fourth edition), pp.478-541. J.I. Kroschwitz, Ed. John Wiley & Sons, New York, NY.

[36] Peterson, D.S. (1997) Practical Guide to Industrial Metal Cleaning. Hanser Gardner Publication, Cincinnati, OH and **McLaughlin, M.C.; Zisman, A.**S. (1998) The Aqueous Cleaning Handbook. The MorrisLee Publishing Group, Rosemont, NJ.

[37] Cox, M.F. (1994) Surfactants. In: Detergents and Cleaners: A handbook for formulators, pp.43-89. R.**K. Lange,** Ed. Hanser Gardner Publications Inc., Munich.

[38] Al-Araji1L., Abd Rahman R. N. Z. R., Basri, Salleh M. A. B., 2007. Minireview : Microbial Surfactant. (AsPac) J. Mol. Biol. Biotechnol., Vol. 15 No.3, p. 99-105 .

[39] Mulligan C. N., 2009. Recent Advances In The Environmental Applications Of Biosurfactants, Current Opinion in Colloid & Interface Science, Vol. 14, No. 5, p. 372-378.

[40] Prommachan O., 2002. Production And Application Of Biosurfactant From BacillusMUV4, Master of science thesis of biotechnology, Prince of songkla university, Thailland, 70 p. PDF/Nature of biosurfactants..

[41] Christofi N., Ivshina I.B, 2002. Microbial Surfactants And Their Use In Field Studies Of Soil Remediation. J. Appl. Microbiol. Vol.93, p. 915–929.

[42] Maier R. M., Pepper I. L., Gerba C. P., 2009. Environmental Microbiology, 2 ème édition, 598 p. **et Marqués A.M., Pinazo A.,**M.J., 2009. The Physicochemical Properties And Chemical Composition Of Trehalose Lipids Produced By Rhodococcus erythropolis 51T7, Chem. Phys. Lip. Vol.158, p.110–117. **ET** COLL.

[43] Banat I. M., 1995. Biosurfactants Production And Possible Uses In Microbial Enhanced Oil Recovery And Oil Pollution Remediation: A Review. Bioresource Technol. Vol. 51, p. 1–12 .

[44] Desai J. D., Banat I. M., 1997. Microbial Production Of Surfactants And Their Commercial Potential, microbiol. and mol. Biol. Reviews, Vol. 61, No. 1, p. 47–64.

[45] Mehdi H., Giti E., 2008. Investigation Of Alkane Biodegradation Using The Microtiter Plate Method And Correlation Between Biofilm Formation, Biosurfactant Production And Crude Oil Biodegradation, International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 62, No. 2 , p.170-178 ET COLL.

[46] Cameotra S. S. , Singh P., 2009. Synthesis Of Rhamnolipid Biosurfactant And Mode Of Hexadecane Uptake By Pseudomonas Species, Microb Cell Fact. Vol. 8, No. 16 **et coll.**

[47] Mensah K.A et Forster C.F. 2003, An examination of the effect of detergents on anaerobic digestion. P: 133-138.

[48] http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/sciences fondamentales-th8/constantes-chimiques-des-solvants-et-produits 42337210/tensioactifs-k342/proprietes-des-agents-tensioactifs k342niv10002.html.

[49] (**Dugniolle**, 1980 ; **Glanic et Benneton**, 1989), THÈSE de DOCTORAT Spécialité : Agronomie, Mr METAHRI Mohammed Saïd.

[50] Directive 2000/60/CE, du 23 octobre 2000 JOCE du 22 décembre 2000 WIKIPIDIA.

[51] Bachi, O.E.K, 2010 : mémoire présenté en vue de L'obtention du diplôme de magister thème diagnostic sur la valorisation de quelques plantes du gardin d'épuration de station du vieux ksar Témacin.Ouargla, 105P.

[52] http://www.aide.be/accueil/epuration/la-pollution-des-eaux.

[53] Eckenfelder W.W, (1982). Gestion des eaux usées urbaines et industrielles. Ed. Lavoisier. Paris, 503p.

[54] LECLERC H, IZARD D, HUSSON M.O,. Microbiologie générale. Doin éditeurs, Paris, 1883, p : 368.

[55] http://www.conservation-nature.fr/article2.php?id=104.

[56] ATTAB Sarah. Mémoire Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de MAGISTER Spécialité : Biologie Option Microbiologie Appliquée.

[57] L. TRIFI ;≪ Dégradation des hydrocarbures aromatiques polycyliques (HAP) par les tensioactifs synthétiques et biologiques≫, Thèse de master université de MEDEA

[58] S.FERHAT ;≪synthése et caractérisation biosurfactant par cellules libres et immmobiliseés sur biopolymére application enviromentale ≫,Thése de magistere Université de MEDEA,(2011).

[59] Y.Taybi , thése de doctorat d'état , Unniversité d'Annaba(2010).

[60] M.Blétry thése de doctorat ,institus Nationnal polytechnique de Gnenoble

France(2004).

[61] Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*., 100: 553- 559.

[62] LATIFA BEN SAAD ÉTUDE DE LA SÉPARATION DES FLUOROQUINOLONES PAR HPLC: APPLICATION À L'ÉTUDE DE LEUR DÉGRADATION PAR RAYONNEMENT GAMMA , these de master Université Tunis El Manar(2013).

[63] les normes francaises NF T90-008 février 2001.

[64] les normes NFEN 872 juin 2005.

[65] NORME INTERNATIONALE ISO 6060 Deuiéme édition 1989-10-15.

[66] A.BENAISSA ;≪Synthése et caractérisation d'un Biosurfactant par cellules libres et immobilisées sur un biopolymére .application envirommentale≫,thése de Magister ,Université de Medea,(2011).

[67] KANOKRAT SAISA-ARD1, SUPPASIL MANEERAT2, ATIPAN SAIMMAI3 (2013). Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology. vol. 94(3) C pp. 275-284

[68] Junhui Zhang, Quanhong Xue, Hui Gao, Hangxian Lai and Ping Wang.Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. Microbial Cell Factories. (2016) 15:168.

[69] Desai, J.D. et Banat, I.M., "Microbial production of surfactants and their commercial potential''. Microbiol Molec Biol. Reviens., V. 61, n° 1, (March 1997), 47-64.

[70] Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A. et Villemur, R., "Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene". Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecul. Cell Biol. Lip, V. 1440, n° 2-3, (September 1999), 244-252.

[71] Wadekar, S. D., Patil, S. V., Kale, S. B., Lali, A.M., Bhowmick, D. N. et Pratap, A. P.,"Structural Elucidation and Surfactant Properties of Rhamnolipids Synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on Sweet Water as Carbon Source and Stabilization Effect on Foam Produced by Sodium Lauryl Sulfate". Tens. Surfact. Deterg., V. 48, n° 1, (November 2010), 286-292.

[72] Abu-Ruwaida.A.S, Batat.I.M, Salem.A, Haditirto.S, Kadri.M, << Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and evaluation>> .Acta.Biotechnologicq 11,
vol 4, 315-324, (1991)

[73] Wong, W.C.J; Zhao, Z. et Zheng, G. "Biosurfactants from *Acinetobacter Calcoaceticus* BU03 enhance the bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons''. Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Wat. Ener., V. 15, n° 1-5, (July 2010).