République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement et de la Recherche Scientifique

Université DR.YAHIA FARES de MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie



Département du Génie des Procédés

Projet de Fin d'Etude

Pour l'obtention de Diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Génie des Procédés Pharmaceutique

Thème :

Dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les tensioactifs synthétiques et biologiques

Présenté par

Trifi Leila

Dirigé par :

Dr : FERHAT Samira

2014 /2015

Remerciements

En premier lieu, je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Je remercie Dr. FARHAT Samira pour avoir assuré la direction de ma thèse, pour ces conseils précieux le long de mon travail de thèse. Je ne saurais trop le remercier pour l'intérêt qu'il a accordé à ce travail et pour les longues heures de discussion qu'il m'a réservée avec une patience inégale.

Tout d'abord, j'adresse mes respectueux remerciements à tous les membres du jury Mme cherifi .H et Mlle KHAOUANE.L qui m'ont fait l'honneur de participer à l'évaluation de mon travail. Je suis certaine de pouvoir compter sur leurs vastes connaissances et leur esprit critique constructif pour m'aider, par leurs commentaires et leurs discussions, à mieux comprendre certains problèmes rencontrés au cours de ce travail de recherche.
Merci pour toutes les remarques constructives apportées à ce manuscrit.

Mes profonds remerciements vont également à Monsieur Maazouz ,
Directeur du hall technologique, pour la confiance qu'il m'a accepté dans le laboratoire, pour sa gentillesse et sa sympathie qu'il a toujours manifestée à mon égard.

Toutes les personnes qui m'ont entourée durant les nombreuses heures de travail au Hall technologique et qui ont toujours manifesté à mon stage leur intérêt et leur aide, leur gaieté et leur bonne humeur, auront toujours dans mon cœur une place privilégiée et dans mon esprit une valeur d'exemple. A Mme BOUISSA S, MLLE ATSAMNIA S, et tous les manipulateurs de laboratoire de microbiologie sans exception mes vifs remerciements.

Il est difficile, dans un si petit espace, de remercier toutes les personnes qui m'ont aider de loin ou de près dans la réalisation de ce mémoire, je remercie tous que je ne suis pas citer.

A TOUS UN GRAND MERCI

Dédicace

Je dédie avec grand plaisir, ce modeste travail :

A tous ce qui témoignent qu'il n'y a de Dieu qu'ALLAH et que Mohamed est le prophète d'ALLAH.

Aux 2 étoiles de ma vie :

- *Ma très chère mère qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie.*
- *Mon très cher père qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis.*

Merci mes parents que dieu les protèges contre tout mal.

A mes très chers frères Mohamed et Abderrazak et sœurs Noura, Chaima et Zahra.

A toute ma famille Trifi sans exception.

A tous mes amis : Asma, Nawel, Imane, Safia , Ratiba , Amel, Selma ,Dalila , Meriem, Zineb, Khaoula ,Hafsa , Latifa, Siham, Amina .....

A tous mes collègues de l'université de MEDEA.

Leila

ملخص

الهدف من هذا العمل هو استخدام السطحي الطبيعية (مادة حيوية فعالة سطحيا) والاصطناعية (دود يسيل كبريتات الصوديوم وتوين 80) للتطبيق البيئي .
في الواقع ذوبا ن الهيدروكربونا ت متعددة الحلقات (النفتالين) و تحليل المعادن الثقيلة في وجود السطحي.
الكائنات الحية الدقيقة المختارة في هذا العمل هي السلالة البكتيرية (لشونفورمي العصوية) لإنتاج مادة حيوية فعالة سطحيا لاستخدامها في هذه الدراسة.

في الجزء الأول من هذه الدراسة قمنا بتقييم فعالية السطحي لإذابة بعض الهيدروكربونات قليلة الذوبان في الماء مثل الهيدروكربونات متعددة الحلقات (حالة النفتالين) .وقد أظهرت التجارب أن من تركيز الحرج , يتم تنفيذ ازالة التلوث.

الجزء الثاني يعرض نتائج تحليل المعادن الثقيلة (النحاس) من قبل السطحية الثلاثة و ذلك باستخدام تركيزات أعلى من تركيزات الحرجة. المقارنة بين تحليل النحاس من قبل السطحية الثلاثة , يظهر أن المفاعل السطحي الحيوي أكثر فعالية من توين 80 و دوديسيل كبريتات الصوديوم.
الكلمات المفتاحية : سطحي , مفاعل سطحي حيوي ,النفتالين, النحاس ,تركيز الحرج, الاذابة ,التحليل

Résumé

L'objectif de ce travail est l'utilisation des tensioactifs naturel (biosurfactant) et synthétique (dodécyl sulfate de sodium et tween 80) pour l'application environnementale. En effet la solubilité des hydrocarbures polycycliques (naphtalène) et la désorption des métaux lourds en présence des tensioactifs.

Les microorganismes choisis dans ce travail sont souche bactérienne (bacillus licheniformis) pour la production de biosurfactant pour l'utilisation dans cette étude.

Dans la première partie de cette étude, on a évalué l'efficacité des tensioactifs à solubilisation certains hydrocarbures peu solubles dans l'eau tels que les polyaromatique (cas du naphtalène). Les essais ont montré qu'à partir de la concentration micellaire critique, la décontamination est réalisée.

La deuxième partie présente les résultats sur la désorption des métaux lourds (cas du cuivre) par les trois tensioactifs, en utilisant des concentrations supérieures à la concentration micellaire critique. La comparaison entre la désorption du cuivre par les trois tensioactifs, ont montré que le biosurfactant est plus efficaces que tween 80 et dodécyl sulfate de sodium.

Mots clés : tensioactifs, biosurfactant, naphtalène, cuivre, concentration micellaire critique, solubilisation, désorption.

ABSTRACT

The objective of this work is the use of natural surfactant (biosurfactant) and synthetic (sodium dodecyl sulfate and tween 80) for environmental application. In fact the solubility of the polycyclic hydrocarbon (naphthalene) and the desorption of the heavy metals in the presence of surfactants.

The microorganisms selected in this work are bacterial strain (Bacillus licheniformis) for the production of biosurfactant for use in this study.

In the first part of this study, we evaluated the effectiveness of surfactants solubilization certain hydrocarbons few soluble in water such as polyaromatic (case naphthalene). Tests have shown that from the critical micelle concentration, decontamination is performed.

The second part presents the results on the desorption of heavy metals (for copper) by the three surfactants, using concentrations above the critical micelle concentration. The comparison between the desorption of copper by the three surfactants, it is shown that the biosurfactant is more effective than tween 80 and sodium dodecyl sulfate.

Key words: surfactants, biosurfactant, naphthalene, copper, critical micelle concentration, solubilization, desorption.

Sommaire

Introduction générale 1

CHAPITRE I : Etude Bibliographique

I. Introduction…… 4

I.1. Généralités sur les tensioactifs…… 4

I.1.1. Définition…….. 4

I.1.2. Classification des tensioactifs……... 5

I.1.2.1. Les tensioactifs anioniques……... 5

I.1.2.2. Les tensioactifs cationiques…….. 6

I.1.2.3. Les tensioactifs zwittérioniques…… 6

I.1.2.4. Les tensioactifs non ioniques.. …… 6

I.1.2.5. Les tensioactifs naturels…… 7

I.1.3. Propriétés physiques des tensioactifs …… 8

I.1.3.1. Tension superficielle…… 8

I.1.3.2. Concentration micellaire critique (CMC)……. 8

I.1.3.3. La Solubilité…….. 10

I.1.4. Pouvoirs des tensioactifs…… 11

I.1.4.1. Pouvoir moussant…….. 11

I.1.4.2. Pouvoir mouillant…….. 11

I.1.4.3. Pouvoir dispersant……. 11

I.1.4.4. Pouvoir émulsionnant……... 11

I.1.4.5. Pouvoir bactéricide……... 11

I.1.5. Production des Surfactants Biologique……. 12

I.1.5.1. Les organismes producteurs…….. 12

I.1.6. Paramètres influençant la production des biosurfactants …… 13

I.1.6.1. Influence de la source de carbone ……. 13

I.1.6.2. Influence de l'azote…… 13

I.1.6.3. Influence du pH…….. 13

I.1.6.4. Influence des sels minéraux …….. 14

I.1.6.5. Influence de l'oxygène …….. 14

I.1.7. Domaines d'application des tensioactifs …….. 14

I.1.7.1. Domaine d'environnement……... 14

I.1.7 .2. Domaine De la détergence …… 14

I.1.7.3. Domaine de la cosmétique…….. 14

I.1.7.4. Domaine pharmaceutique……...…… 14

I.1.7.5. Domaine des usages industriels et agricoles…….. 15

I.2. Application environnementale des tensioactifs ……. 15

I.2.1. Généralité sur Hydrocarbures……... 15

I.2.1.1. Définition et caractéristiques……... 15

I.2.1.2. Origine des hydrocarbures……... 15

I.2.1.3. Classification…… 16

I.2.1.3.1. Hydrocarbures saturés…….. 16

a. Alcanes linéaires……... 16

b. Alcanes ramifiés……... 16

c. Cycloalcanes……. 16

I.2.1.3.2. Hydrocarbures aromatique…… 16

I.2.1.3.3. Les asphaltènes……. 17
I.2.1.3.4. Les composés polaires…….. 17
I.2.1.4. Structure et propriétés des HAP…… 17
I.2.1.5. Propriétés des HAP et leur sort dans l'environnement…… 18
I.2.1.6. Naphtalène ……... 19
I.2.1.6.1. Propriétés Physiques ……. 20
I.2.1.7. Dégradation des HAP …….. 20
I.2.1.7.1. Dégradation abiotique des HAP……... 21
a. Oxydation …… 21
b. Dégradation photochimique …… 21
I.2.1.7.2. Biodégradation des HAP ……. 22
I.2.1.7.2. 1. Dégradation par les bactéries……... 23
I.2.1.7.2. 2. Dégradation en conditions anaérobies …… 24
I.2.1.7.3. Dégradation des HAP en présence de tensioactifs …….. 25
I.3. Généralité sur Les métaux lourds ……... 26
I.3.1. Définitions……. 26
I.3.2. Origine des métaux lourds ……... 26
I.3.3. Comportement et devenir des métaux lourds dans les sols …… 27
I.3.4. Effet sur l'environnement……. 27
I.3.5. Le Cuivre…….. 28
I.3.5.1. Origine des contaminations……... 28
I.3.5.2. Propriétés chimiques……. 29
I.3.5.3. Effet du cuivre sur l'homme et l'environnement ……. 29
I.3.6. La biodégradation des métaux dans le sol……. 29
I.4. Conclusion……. 30
CHAPITRE II : Partie Expérimentale
II.1.Introduction……..... 32
II. 2. Matériel …… 32
II.2.1. Matériel non biologique……. 32
II.2.2. Matériel biologique ……... 32
II.3. Méthode …… 32
II.3.1. Conditions de culture ……... 32
II.3.2. Tension superficielle …… 33
II.3.3. Optimisation des paramètres opératoires …… 34
II.3.4. Extraction de biosurfactant…… 34
II.3.5. Application environnementale des tensioactifs……. 35
II.3.5.1. Solubilisation d'hydrocarbures……. 35
II.3.5.1.1. Solubilisation du Naphtalène……... 35
II.3.5.2. Désorption de cuivre par les tensioactifs…….. 35
II.4. Résultats et discussions……..... 36
II.4.1. Mesure La tension superficielle de biosurfactant…… 36
II.4.2. Extraction de biosurfactant…….. 36
II.4.3. Applications environnementales……... 37
II.4.3.1. Solubilisation du naphtalène…….. 37
II.4.3.2. Désorption de cuivre par les tensioactifs…… 39
II.5. Conclusion……. 41
Conclusion générale…… 42
Références bibliographiques……. 43
Annexe

Liste des figures

Figure 1	Représentation schématique d'un tensioactif
Figure 2	Formule de la molécule de dodecyl sulfate de sodium (SDS)
Figure 3	Formule de la molécule de Tween 80
Figure 4	Formation de micelles
Figure 5	Solubilité d'un tensioactif ionique en fonction de la température
Figure 6	Structure chimique de 16 HAP de référence
Figure 7	Les différentes voies de dégradation microbienne des HAP
Figure 8	Dégradation anaérobie du naphtalène
Figure 9	Incubateur shaker
Figure 10	Tensiomètre a anneau
Figure 11	Extraction de biosurfactant par l'acétone
Figure 12	Mécanisme d'extraction de biosurfactant par acétone
Figure 13	Solubilisation du Naphtalène par les tensioactifs
Figure 14	la densité optique en fonction de la concentration

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification des tensioactifs en fonction de la nature de leur tête polaire
Tableau 2	Propriétés Physique de Naphtalène
Tableau 3	Propriétés chimiques du cuivre
Tableau 4	densité optique des tensioactifs en fonction de la longueur d'onde
Tableau 5	représente la densité d'absorption en fonction de la concentration
Tableau 6	Pourcentages de récupérations de cuivre par les différents tensioactifs

Liste des abréviations

CMC : concentration micellaire critique.

DO : Densité optique

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SDS : dodecyl sulfate de sodium

TK : Température de kraft

λ : Longueur d'onde

***ϒ*: ** Tension superficielle

***ρ* :** Masse volumique

mN /m : Milli newton/mètre

g/l : gramme par litre

mg/ml : milligramme par millilitre

mg/l : milligramme par litre

ml : millilitre

l : litre

Mol .L^{-1} : mole par litre

g /cm^3 : gramme par centimètre cube

µl : micro litre

°C : degré Celsius

h : heure

min : minute

% : pourcentage

tr/min : tour par minute

nm : nanomètre

v/v : volume par volume

Listes des annexes

ANNEXES A : Matériels utilisés

ANNEXES B : Réactifs utilisés

Les tensioactifs sont utilisés dans la plupart des actes de la vie courante. L'application la plus connue est la détergence. 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.

Ils sont également présents dans d'autres produits tels que des peintures, des produits agrochimiques, formulations pharmaceutiques et même en tant que substituts des tensioactifs pulmonaires chez les nouveaux nées prématurés. 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 [1].

La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [2]. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et qui sont également efficaces, dans le cas de micro-organismes extrêmophiles, à des températures, des pH et des salinités extrêmes [3].

Le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux. On peut aussi avoir une dégradation des sols à cause de cette pollution [4].

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) contaminent tous les milieux, dans lesquels ils peuvent exercer des effets toxiques. Leur présence dans l'ensemble des compartiments de l'environnement (eau, air et sol) résulte à la fois de processus naturels comme le volcanisme ou les feux de forêts et majoritairement des activités anthropiques. Les HAP sont produits lors de la combustion incomplète de la matière organique, notamment des combustibles fossiles (centrales thermiques, moteurs thermiques) [5].

La pollution simultanée aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et aux métaux lourds a plus particulièrement attiré l'attention du publique, ainsi que de la

communauté scientifique. Ces deux types de Contaminants coexistent en effet fréquemment sur des sols pollués de friches industrielles [6]. Ils présentent un danger pour le sol, la nappe phréatique, leurs usagers, ainsi que le voisinage puisque ces composés se sont révélés hautement toxiques et cancérigènes dépendamment de leur concentration respective [6].

Notre travail a été réalisé afin d'étudier l'effet des tensioactifs sur la solubilisation et la dégradation des hydrocarbures polycycliques (HAP) ainsi l'étude de la désorption de métaux lourd. La solubilisation est définie comme la préparation d'une solution isotropique thermodynamiquement stable d'une substance qui est normalement insoluble ou très peu soluble dans un solvant donné par l'ajout d'un ou de plusieurs composés amphiphiles [7].

Nous avons structuré notre mémoire en deux parties :

- La première partie consiste à la recherche bibliographique où sont exposées les différentes classes de tensioactifs (naturelle et Synthétique), leurs propriétés, leurs mécanismes de production du biosurfactants, en plus de différents Domaines d'application des tensioactifs et surtout leurs applications environnementales.
- La deuxième partie décrivant premièrement le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de notre travail, on a commencé par la production du biosurfactant par cellules libres de *Bacillus licheniformis*, ensuite par deux applications environnementales : la solubilisation d'un hydrocarbure polyaromatique (naphtalène) et la désorption des métaux lourds (cuivre).

Deuxièmement les résultats expérimentaux obtenus lors de cette étude et interprétations de ces résultats.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction

Un tensioactif est un composé qui diminue la tension superficielle grâce à sa structure spéciale. Ils sont utilisés dans de nombreux domaines tels que pour les lessives, les détergents, les agents mouillants, etc... , dans une concentration particulière que l'on appelle la CMC (Concentration Micellaire Critique). Les tensioactifs peuvent se regrouper, ces agrégats s'appellent les micelles, elle sépare deux milieux distincts [8].

L'application d'agents tensioactifs aux environnements de sols contaminés par des hydrocarbures notamment les HAP et les métaux lourds est devenue un moyen possible d'augmenter la biodisponibilité de ces composés hydrophobes et de faciliter leur biodégradation [9-10].

I.1. Généralités sur les tensioactifs

I.1.1. Définition

Les tensioactifs ou surfactants, appelés également agents de surface d'origine naturelle ou Synthétique ont fait l'objet de nombreuses études fondamentales et appliquées [11-12].

De telles molécules sont dites « actives » à la surface parce qu'elles conditionnent la tension de surface d'une solution. Ces molécules sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent une structure moléculaire spéciale : d'une part une chaîne à caractère lipophile (ou queue hydrophobe) et d'autre part, un groupement hydrophile dit tête polaire comme indiqué sur la (figure1).

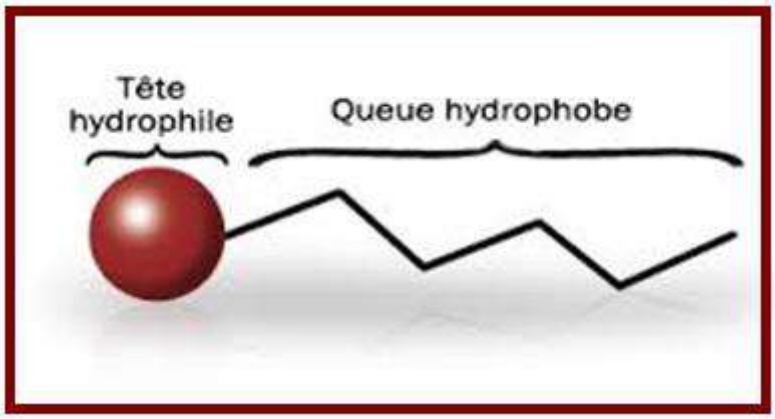


Figure1 : Représentation schématique d'un tensioactif

La queue hydrophobe correspond généralement à une longue chaine hydrocarbonée linéaire qui peut contenir des hétéroatomes comme l'oxygène, l'azote, le souffre ou le fluor. La tête hydrophile est habituellement constituée d'un atome, d'un groupement d'atomes ou d'un ion.

Selon sa nature, on distingue les composés ioniques et les non-ioniques. Les premiers sont classés selon la charge de la tête hydrophile : anionique, cationique et zwitterionique (possédant deux charges de signes opposés). Les tensioactifs non ioniques peuvent comporter une chaine hydrocarbonée sur laquelle sont fixés des groupements polaires (alcool, éther ou amine) [13].

I.1.2. Classification des tensioactifs

Il existe différentes classifications possibles des tensioactifs. Ils peuvent être classés en fonction : de la nature de leur tête polaire (non ionique, anionique, cationique ou amphotère) (Tableau 1), et de leur origine, naturelle ou synthétique.

I 1.2.1. Les tensioactifs anioniques

Les tensioactifs anioniques comportent un groupement ionique chargé négativement en solution aqueuse en l'occurrence carboxylate, sulfate, sulfonate ou phosphate.

Ces agents tensioactifs sont les plus utilisés industriellement. Le tensioactif qui a été utilisé dans notre travail est le dodécyl sulfate de sodium (SDS). Il s'agit d'un tensioactif anionique, sa molécule est constitué d'une chaîne aliphatique hydrocarbonée avec 12 atomes de carbone, et d'une tête polaire formée d'un groupement sulfate. La tête polaire se dissocie dans l'eau, le groupement reste attaché à la chaîne, tandis que le contre-ion Na+ est libéré en solution. Cette molécule a une masse molaire de 288,38 g/mole. La structure du SDS est représentée sur la (figure2).

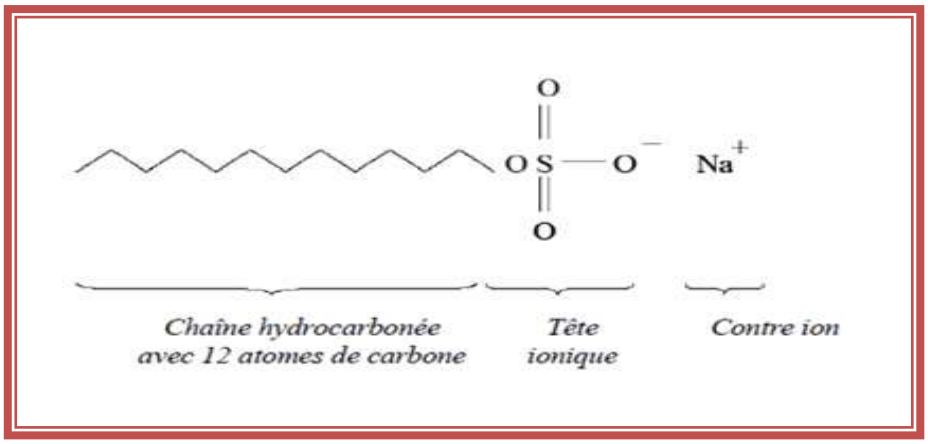


Figure 2 : Formule de la molécule de dodecyl sulfate de sodium (SDS) [14]

Ce type de surfactant est généralement utilisé pour augmenter la durée de vie des mousses ou comme détergent, ce qui explique sa présence dans de nombreux produits cosmétiques tels que les shampoings et les dentifrices ainsi que dans la plupart des détergents à vaisselle [14].

I.1.2.2. Les tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques possèdent un groupement ionique chargé positivement en solution aqueuse ; ce sont généralement des sels d'ammonium quaternaire. Ils sont largement utilisés en tant qu'agents de conditionnement dans les produits de soins pour cheveux et dans ceux pour les textiles.

I.1.2.3. Les tensioactifs zwittérioniques

Ces surfactants Comportent deux groupements ioniques, l'un cationique et l'autre anionique.
Le pH détermine le caractère dominant :

- anionique à pH alcalin
- cationique à pH acide
- près du point isoélectrique : amphotère

I.1.2.4. Les tensioactifs non ioniques :

Dans tensioactifs non ioniques, l'hydrophile est apportée par des groupements fonctionnels non chargés (alcool, éther, ester, amide) contenant des hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène. En raison de la faible contribution hydrophile de ces fonctions, les composés tensioactifs non ioniques sont le plus souvent polyfonctionnels [15]. Par exemple Tween 80. Est un (polysorbate) est le nom commun de la sorbitane-momolaurat du polyoxyéthylène (80).

Tween80 est un tensioactif non ionique largement répondu, qui a une concentration micellaire critique très base, d'environ $1.2.10^{-5}$ mol/l .Cette molécule a une masse molaire de 1310g/mole.

-La structure chimique du Tween 80 est représentée sur la (figure3).

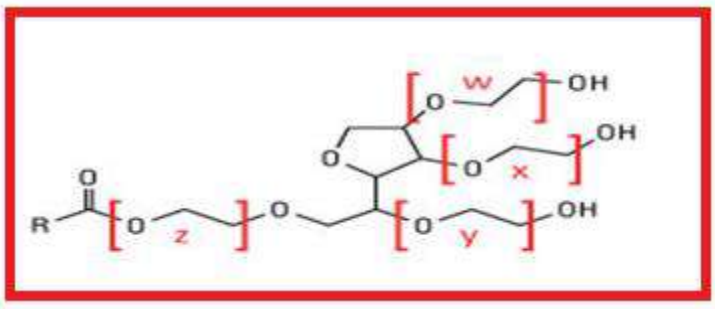


Figure 3 : Formule de la molécule de Tween 80

Tableau 1 : Classification des tensioactifs en fonction de la nature de leur tête polaire

Classes	Exemples de tensioactifs Principales	propriétés et applications
Anioniques	savons (RCOO-) carboxylates (RCO2-) sulfonates (RSO3-)	agents nettoyants (détergents) agents moussants
Non ioniques	Ethoxylates polyols alkylpolyglucosides (APG)	Emulsifiants mouillants non irritants (produits de soin de la peau)
Cationiques	amines (R3NH+) ammoniums quaternaires (R4N+) esters d'ammonium quaternaire	adoucissants textiles émulsionnants, bactéricides shampoings
Amphotères	Bétaïnes phospholipides	Moussants détergents peu irritants (hygiène corporelle)

I.1.2.5. Les tensioactifs naturels

Le terme de tensioactif naturel est ambigu. Pris au sens strict, un tensioactif naturel est issu de ressources naturelles. Cette source peut être d'origine animale ou végétale. Les tensioactifs naturels doivent être obtenus par des procédés de séparation tels que l'extraction, la précipitation ou la distillation qui n'introduisent pas de pollution.

On distingue cinq grandes classes de biosurfactant: les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres [16].

- **Les glycolipides:** sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaine d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques [17].
- **Les lipopeptides:** sont composes d'un lipide attache a une chaine polypeptide. Lipides d'ornithine sont les plus connus [16].

- **Les phospholipides:** sont formes de groupements alcool et phosphate et de chaine lipidique [18].
- **Les lipopolysaccharides:** ou polymériques sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras [16].
- **Acides gras et les lipides neutres** : Les acides gras produits à partir d'alcanes à la suite d'oxydations microbiennes ont été considérés comme des agents de surface. En plus des acides à chaine droite, les microorganismes produisent les acides gras complexes contenant des groupes -OH et des branches alkyliques [19].

I.1.3. Propriétés physiques des tensioactifs

I.1.3.1. Tension superficielle

La tension superficielle a pour origine la différence d'énergie entre une molécule se trouvant à la surface d'un liquide et une autre molécule identique se trouvant à l'intérieur du liquide. Cette différence est dûe au milieu qui est caractérisé par une symétrie à l'intérieur du liquide et l'absence de cette même symétrie à la surface. Les molécules se trouvant à l'interface liquide/air sont toujours soumises à une force de rappel vers l'intérieur du liquide. Pour augmenter la surface du liquide d'une aire (ΔS), il faut fournir une énergie (ΔG) par conséquent le travail peut s'écrire :

$$\gamma = -\Delta G/\Delta S$$

Cette grandeur est appelée tension superficielle et son unité dans le système international est (N/m^2). En pratique on utilise mN/m^2, ce qui correspond au dyne/cm [20].

I.1.3.2. Concentration micellaire critique (CMC)

A faibles concentrations le composé tensioactif se trouve sous forme de monomère.

Au-delà d'une certaine concentration, un nouveau phénomène apparaît, c'est l'agrégation des molécules de tensioactifs sous forme de micelles (Fig4). La concentration à laquelle se produit ce phénomène est appelée concentration micellaire critique (CMC) [21].

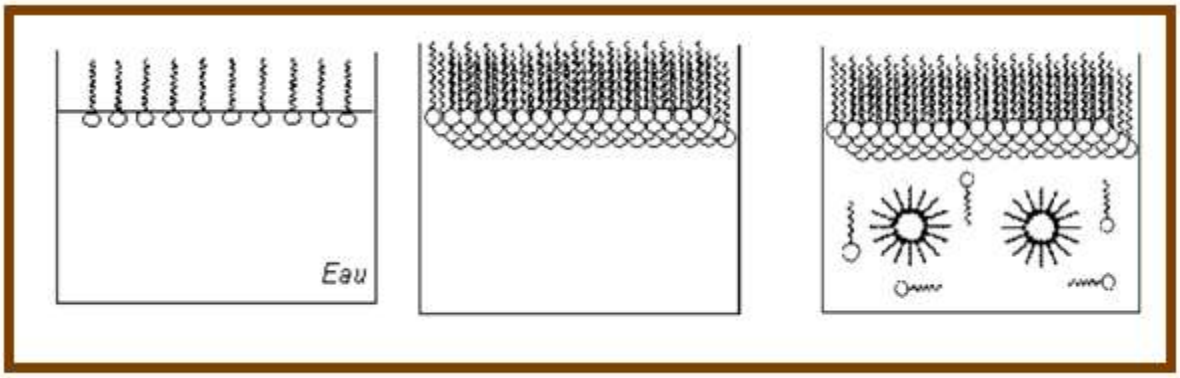


Figure 4 : Formation de micelles

C'est la concentration à partir de laquelle un composé tensioactif s'auto-associe sous forme de micelles en solution aqueuse [21- 22].

La valeur de la CMC est une caractéristique du tensioactif : elle dépend de la nature chimique du tensioactif (longueur de la chaîne lipophile, nature de la tête polaire) mais également de facteurs externes tels que la concentration en électrolytes ou la température.

Quelques règles générales peuvent être mentionnées :

- CMC des tensioactifs non ioniques (de l'ordre de 10^{-5} M) sont inférieurs aux CMC des tensioactifs ioniques (de l'ordre de 10^{-3} M).
- Pour une même classe de tensioactifs, la valeur de la CMC diminue lorsque le caractère hydrophobe augmente (augmentation du nombre d'atomes de carbone).
-La valeur de la CMC augmente avec le caractère hydrophile du tensioactif.
-La CMC des tensioactifs ioniques diminue en présence de sels.
-La CMC des tensioactifs non ioniques est peu affectée par la présence d'électrolytes.

Pour une température et une pression données d'autre part, et pour un tensioactif donné dans un solvant donné d'autre part, le nombre de molécules par micelle est une constante ainsi que la concentration à laquelle les agrégats se forment. Cette concentration micellaire (CMC) est une grandeur caractéristique du composé puisque elle détermine l'organisation de ses molécules au sein d'une solution et détermine le mécanisme d'agrégation.

La détermination de la CMC à une grande importance dans l'étude du comportement des tensioactifs en solution aqueuse, c'est pour cette raison que plusieurs méthodes ont été développées pour étudier les plus faciles à mettre en œuvre : conductivité électrique, tensiomètre [21].

I.1.3.3. La Solubilité

Pour les tensioactifs ioniques, la courbe représentant la solubilité en fonction de la température (figure 5) fait apparaître un comportement irrégulier. A partir d'une certaine température T_k, dite température de Krafft, la solubilité augmente brusquement. Sur ce même graphe, la courbe représentant la CMC en fonction de la température a été ajoutée. La température de Krafft correspond à l'intersection de la courbe de solubilité et celle de la CMC. En dessous du point de Krafft, la solubilité est faible ; elle est uniquement due aux monomères présents en solution. Lorsque ces derniers atteignent la saturation (à la CMC), le tensioactif précipite sous forme de solide hydraté. Au-dessus de T_k, la solubilité s'accroît rapidement avec la température. Ceci est lié à la formation de micelles puisque l'activité des micelles reste constante [23] .Ce sont les micelles qui font accroître la solubilité. Le tensioactif se retrouve à la fois sous forme de micelles et de monomères.

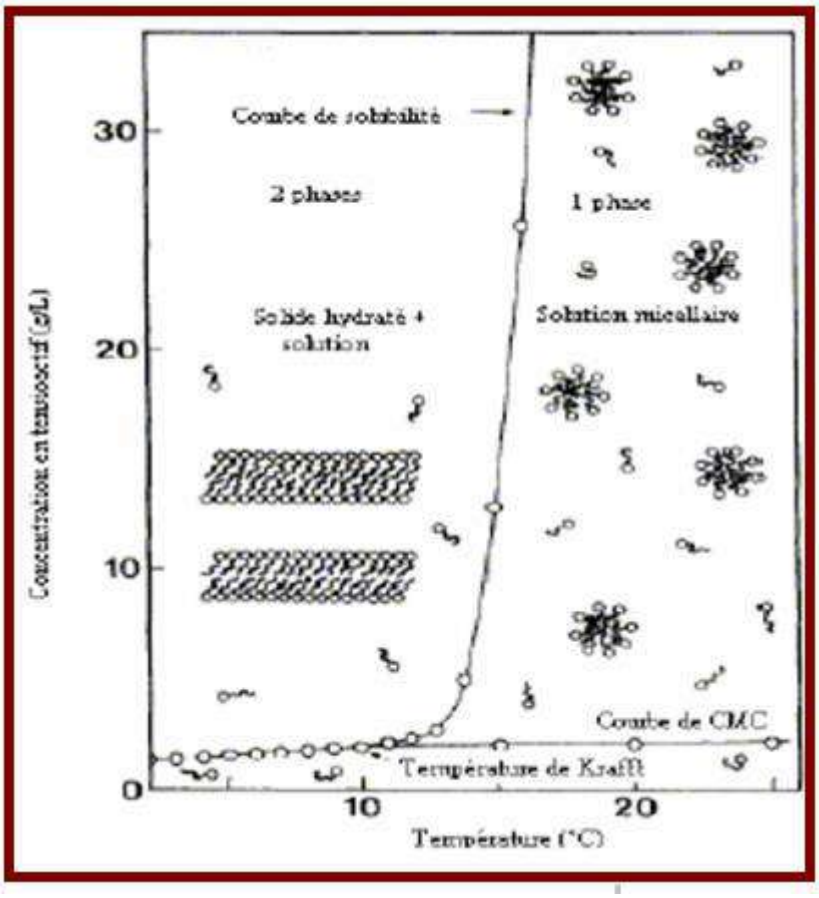


Figure 5: Solubilité d'un tensioactif ionique en fonction de la température [24].

La température de Krafft des tensioactifs anioniques varie en fonction de la nature du groupement hydrophobe, mais également des ions présents en solution. Les tensioactifs non

ioniques ne présentent pas de température de Krafft, mais se caractérisent par une température appelée point de trouble.

I.1.4. Pouvoirs des tensioactifs

Les tensioactifs présentent certains pouvoirs au-delà d'une certaine concentration dite «micellaire critique». En dehors de leurs emplois dans le textile, il était nécessaire d'établir une nomenclature de ces produits et d'apporter une étude critique de leurs domaines d'applications dans les industries du lavage et du nettoyage [22].

I.1.4.1. Pouvoir moussant

Le pouvoir moussant est le degré d'aptitude d'un tensioactif à pouvoir former une mousse stable et persistante [22]. La mousse est généralement définie comme étant une dispersion de gaz dans un liquide de telle façon que sa densité approche celle du gaz. Le pouvoir moussant et la stabilité de la mousse dépendent de [20] :

-La concentration en acides gras ;

-La nature des acides gras et la température.

Il est maximal entre 20 et 40°C pour les composés ayant une longueur de chaîne de 12 à 14 atomes de carbone.

I.1.4.2. Pouvoir mouillant

Le pouvoir mouillant est la tendance que possède un liquide à s'étaler sur une surface ; c'est la conséquence de diminution de la tension superficielle de l'eau. Il est accentué pour des longueurs de chaîne correspondant à 8-10 atomes de carbone.

I.1.4.3. Pouvoir dispersant

Comme nous le savons, les micelles se repoussent l'une l'autre et elles se retrouvent donc dispersées dans le mélange eau-liquide (vaisselle). Pour des raisons de densité (l'huile est moins dense que l'eau), elles vont remonter vers la surface du liquide. On parle du pouvoir dispersant des détergents [22].

I.1.4.4. Pouvoir émulsionnant

Le pouvoir émulsionnant est le nombre de lavage nécessaire pour éliminer toute la salissure. Il est variable selon les cas ; par exemple, en dessous du point de Kraft les chaînes longues donnent les résultats les plus favorables. En dessous de 60°C, la détergence augmente, en particulier pour les longueurs de chaîne en C18 [22].

I.1.4.5. Pouvoir bactéricide

Parmi les tensioactifs anioniques, le savon présente un pouvoir antiseptique marqué, mais la plupart des auteurs semblent être d'accord pour considérer que ce pouvoir est principalement dû au fait de sa grande capacité à éliminer les bactéries présentes dans les surfaces cutanées.

Cependant, cet effet n'est pas limité à ce point de vue, car le savon est un bon germicide pour certaines bactéries (streptocoques, pneumocoques, méningocoques, bacilles diphtériques et bacilles influenza) ; cependant, il agit assez faiblement sur le staphylocoque et le bacille typique [25].

Cette propriété est intéressante à mentionner pour les emplois en blanchissement et particulièrement dans la tannerie (dans les travaux de rivière) où les peaux nécessitent une désinfection absolue afin de contourner leur putréfaction.

I.1.5. Production des Surfactants Biologique

Le principal frein à l'utilisation des biosurfactants est leur coût. En effet, Bognolo [26] indique que les prix varient de 8 €.mg^{-1} pour de la Surfactine purifiée à 98 % (utilisations bio-médicales) à 1- 3 €.k g^{-1} pour des formulations d'Emulsan utilisées dans les années(80) pour le nettoyage des cuves. De récentes estimations indiquent un coût de revient de 2 à 16€.kg^{-1} [26]. Lang et Wullbrandt [27] indiquent que pour la production de rhamnolipides en grande quantité dans des fermenteurs de 20 à 100 m^3, les coûts diminuent de 16 à 4 €.kg^{-1}. Par comparaison, les coûts de surfactants chimiques sont de l'ordre de 0,5 à 2 €.kg^{-1}[28].

Ainsi, le succès de l'utilisation et la production des biotensioactifs passe par une diminution des coûts de production ; Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Par exemple, Makkar et Cameotra [28] indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles d'une part pour diminuer les coûts, et d'autre part diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées). Une étude réalisée par Mercade et Manresa [29] reporte des taux de production de rhamnolipides de 1,4 g.l^{-1} pour des *Pseudomonas* cultivées sur des sous-produits industriels.

I.1.5.1. Les organismes producteurs

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie [30] dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [26-30]. Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries.

Le principal rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible [31-32]. Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les HAP. Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et

d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa UG2*, on obtient un mélange de deux, voire quatre rhamnolipides [33].

Bien que de nombreuses espèces produisent des biotensioactifs, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées [34].

La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance. Les molécules de biosurfactant sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu [35].

I.1.6. Paramètres influençant la production des biosurfactants

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

I.1.6.1. Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. Les sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides. Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles, comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive [36]. En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes [37].

I.1.6.2. Influence de l'azote

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitante. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices [38].

Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant [39].

I.1.6.3. Influence du pH

Pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardia corynbacteroides* sont inaffectées par des pH variant de 6,5 à 8,0 [40].

I. 1.6.4. Influence des sels minéraux

Il semblerait qu'une concentration limitant en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production [41].

I.1.6.5. Influence de l'oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance [39].

I.1.7. Domaines d'application des tensioactifs

Les domaines d'application des tensioactifs sont multiples. Ils jouent le rôle soit de matière première de base pour la formulation de produits détergents, cosmétiques et autres, soit de produits auxiliaires dans les procédés de fabrication de l'industrie textile, des métaux, du cuir, du pétrole, etc.

I.1.7.1. Domaine d'environnement :

Dans le domaine de la protection de l'environnement et la remédiation, les biosurfactants (Rhamnolipides) sont utilisés dans la dépollution marine et des sols contamines par les hydrocarbures [42].

I.1.7.2. Domaine 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 quant à 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 [43].

I.1.7.3. Domaine de la cosmétique

On distingue deux grands domaines, la cosmétique rincée (produits d'hygiène lavants 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 [43].

I.1.7.4. Domaine pharmaceutique

La pharmacie utilise un grand nombre de tensioactifs. Ils entrent dans les formulations de principes actifs dans les pommades, sirops et autres. Les liposomes en tant que vésicules phospholipidiques bi lamellaires, sont ainsi un cas particulier d'émulsion d'eau dans l'huile où la solution aqueuse de principe actif est emprisonnée dans deux parois hydrophobes

formant des microgouttelettes dispersées dans l'huile. Ils ont aussi des applications dans le domaine médical [44].

I.1.7.5. Domaine des usages industriels et agricoles :

De nombreux domaines sont concernés : les industries des additifs alimentaires, des céramiques, du cuir, des matières plastiques, métallurgique, minière, du papier, des peintures, du pétrole, routière, textile… Les produits phytosanitaires et les engrais sont également de gros consommateurs de tensioactifs [45].

I.2. Application environnementale des tensioactifs

a. Partie 1

I.2.1. Généralité sur Hydrocarbures

I.2.1.1. Définition et caractéristiques

Les hydrocarbures d'origine organique se forment à partir de débris d'algues, de résidus de la faune marine et de plancton. Alors le vieillissement, la température et la pression (qui s'exerce sur les fonds marins) transforment cette substance organique en hydrocarbures. Les hydrocarbures (pétrole brut et gaz naturels) sont des molécules composées uniquement d'atomes de carbone (C) et d'hydrogène(H), ils ont pour formule brute CnHm où n et m sont deux entiers naturels [46].

I.2.1.2. Origine des hydrocarbures

Les rapides transformations chimiques et mécaniques du pétrole déversé dans l'environnement terrestre et du fait des mécanismes d'altération (évaporation, dissolution, photo oxydation, biodégradation…), sont souvent un obstacle à la détermination de son origine. Par conséquent, si un pétrole ne peut être rapidement analysé après son introduction dans le milieu naturel, son identification devient très difficile [47].

Les hydrocarbures dans l'environnement peuvent avoir plusieurs origines :

- Les hydrocarbures fossiles, qui proviennent de la décomposition d'une grande quantité de matière organique coincée entre deux couches sédimentaires. Cela demande des caractéristiques géologiques passées spécifiques ce qui explique la faible quantité de ressources disponibles.
- Les hydrocarbures actuels, qui sont produits par des bactéries décomposant la matière organique. Cette production a lieu essentiellement dans les zones humides (tourbières, marais) et en quantité limitée. Le changement climatique pourrait accroitre cette production dans les zones actuellement gelée et relâcher de grandes quantités de méthane dans l'atmosphère terrestre ce qui accentuerait d'autant plus l'effet de serre.

- Les rejets industriels et urbains, qui sont les sources d'hydrocarbures pétroliers pyrolytiques [48].

I.2.1.3. Classification

Les hydrocarbures pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentés en proportions variables selon l'origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) [48].

I.2.1.3.1. Hydrocarbures saturés

Parmi les hydrocarbures saturés on distingue:

a. Alcanes linéaires

Les alcanes linéaires (n-alcanes, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de leur chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).

b. Alcanes ramifiés

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes.

c. Cycloalcanes

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut.

I.2.1.3.2. Hydrocarbures aromatique

- ✓ **Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)**

Les HAP sont constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène formant au moins deux anneaux aromatiques condensés [49-50]. Le terme « aromatique » sert à déduire la classe des composés qui comportent des cycles de type benzénique. Le plus simple hydrocarbure aromatique est le benzène (C_6H_6), il fut découvert par Faraday en 1825 dans le gaz d'éclairage. A l'état pur, les HAP sont des solides souvent colorés et cristallins à température ambiante. Leurs propriétés physico-chimiques varient avec leur masse molaire et leur structure [51] .Les HAP résultent de la combustion incomplète de la matière organique [52] qui peut provenir de sources naturelles (feux de forêt, éruptions volcaniques, etc.) ou

anthropogéniques (usines à gaz, industries du bois et pétrolières, fumées de cigarettes, utilisation de combustibles, etc.) [53].

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et poly aromatiques, dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6, sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques [54]. En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier.

I.2.1.3.3. Les asphaltènes

Les asphaltènes représentent la fraction la plus lourde du pétrole. Bien que ces produits soient souvent présents en faible quantité, ils ont une influence considérable sur les propriétés physico-chimiques du brut. Leur capacité à floculer, à s'adsorber sur des surfaces et à former des dépôts solides, est à l'origine de nombreux problèmes aussi bien du point de vue exploitation des gisements, que du raffinage.

Les asphaltènes sont constitués de molécules polycycliques à haut poids moléculaire, contenant des hétéroatomes tel que l'azote, le soufre et l'oxygène [55].

I.2.1.3.4. Les composés polaires

Les composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques, telles que :

- ✓ **Composés oxygénés**: phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,…
- ✓ **Composés soufrés**: mercaptans, sulfures, disulfures,…
- ✓ **Composés azotés**: pyridines, quinoléines,…

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés. Les métaux sont également présents, mais à l'état de traces. Les plus abondants sont le vanadium et le nickel, mais aussi du fer, du sodium, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés [48].

I.2.1.4. Structure et propriétés des HAP

Les HAP sont des molécules organiques, neutres, non polaires, constituées de deux ou plusieurs cycles benzéniques liés dans des arrangements linéaires, anguleux ou en grappes. Les propriétés physico-chimiques des HAP sont liées à leur structure. Leur stabilité est fonction de l'arrangement des cycles ; les HAP angulaires sont les plus stables et les linéaires les moins stables. Ils sont caractérisés par une faible solubilité dans l'eau, qui est inversement proportionnelle au nombre de cycles de leur molécule. Du fait de leur forte hydrophobicité, ces molécules forment des liaisons plus ou moins stables avec les régions hydrophobes de la matière organique et persistent ainsi dans l'environnement [47].

Les HAP se subdivisent en deux groupes :

- **les légers**, dont la masse molaire est comprise entre 128 et 180 g. mol-1 (HAP de moins de quatre cycles) ;
- **les lourds** (au moins quatre cycles) dont les masses molaires varient de 200 à 280 g. mol-1.

Les HAP ont un point de fusion supérieur ou égal à 80°C et un point d'ébullition élevé, compris entre 200°C et 500°C, ce sont des composés semi volatiles. La solubilité des HAP décroît très rapidement avec l'augmentation du nombre de cycles aromatiques. Il en va de même pour leur volatilité [56]. La solubilité est également fonction de la fraction molaire de chaque composé dans le mélange de polluant, ainsi que de la teneur en matière organique de la phase particulaire [57].

De plus, les HAP sont adsorbables sur divers supports solides et existent fréquemment sous cette forme dans l'environnement [56]. Les HAP présentent plusieurs propriétés liées à l'aromaticité. Ils réagissent ainsi avec des réactifs électrophiles comme le dibrome Br2, pour conduire à des produits de substitution, plutôt qu'à des produits d'addition [56- 58].

I.2.1.5. Propriétés des HAP et leur sort dans l'environnement

Les HAP sont des composés organiques aromatiques hydrophobes fréquemment retrouvés dans l'environnement [59]. Ils ont tendance à s'adsorber très facilement sur le carbone organique et les particules du sol. Ils sont récalcitrants et persistants dans les sols. Leur persistance dans l'environnement augmente généralement avec leur poids moléculaire et donc avec le nombre de cycles aromatiques présents dans leurs molécules [60-61].

La Figure 5 : présente la structure de 16 HAP de référence.

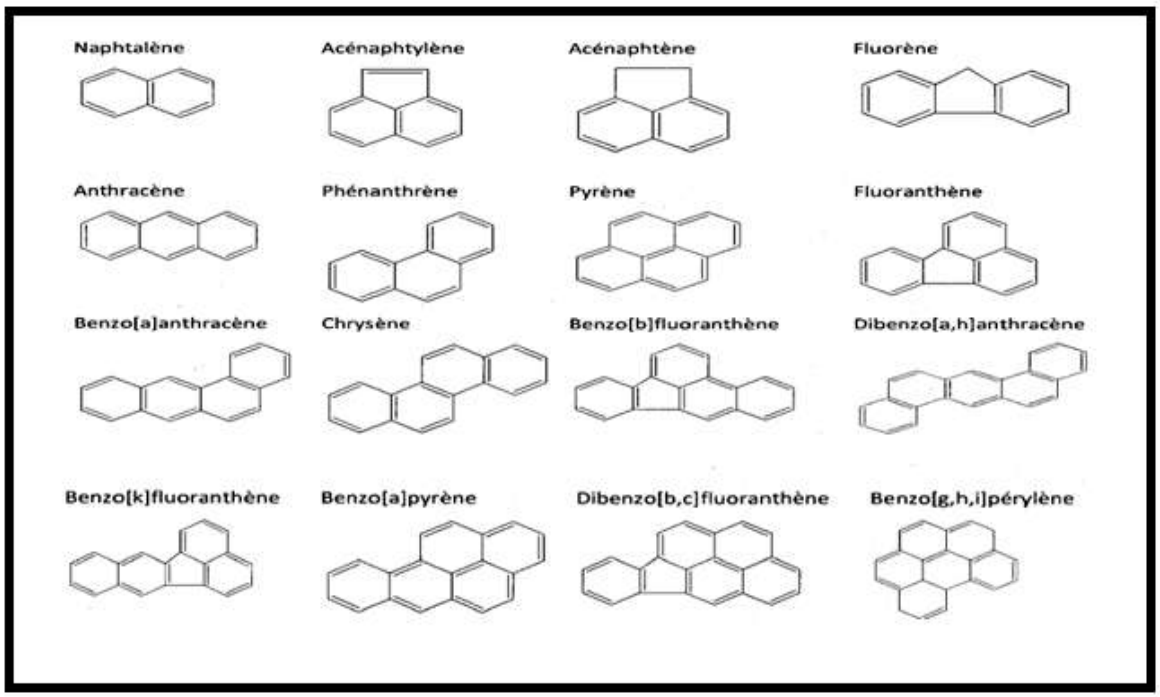


Figure 6: Structure chimique de 16 HAP de référence

Ces composés organiques ont la particularité de posséder au moins deux noyaux aromatiques responsables de leur très grande stabilité dans l'environnement.

Dans les sols, les HAP peuvent avoir différents sorts ou devenirs :

- ✓ **Volatilisation :** migration et dégradation des substances dans l'air.
- ✓ **Adsorption :** association des composés aux particules du sol (comme les colloïdes).
- ✓ **Lixiviation :** solubilisation et mobilité des composés dans l'eau du sol.
- ✓ **Décomposition chimique :** dégradation chimique de composés ou association des composés avec des molécules aux surfaces des particules du sol et formation de complexes.
- ✓ **Biodégradation :** dégradation des composés par la biomasse microbienne.
- ✓ **Bioaccumulation :** adsorption dans les lipides des organismes vivants et accumulation dans la chaîne alimentaire.

Au cours de cette étude nous avons choisi comme HAP modèles : le naphtalène

I.2.1.6. Naphtalène

Les sources de naphtalène dans l'environnement sont multiples. Le naphtalène est utilisé comme intermédiaire de synthèse dans la fabrication d'anhydride phtalique (plus de 60% de la production), servant à produire des plastifiants, résines, teintures, papiers d'emballage,

répulsifs pour insectes (mites notamment) [62-63] En dehors des zones industrielles, le chauffage résidentiel, les répulsives antimites et les émissions provenant des gaz d'échappement des véhicules, sont identifiés comme étant à ce jour les trois principaux contributeurs à l'émission de naphtalène dans l'environnement [64].

I.2.1.6.1. Propriétés Physiques

Le naphtalène se présente sous des formes solides variées (cristaux, poudre, aiguilles ou écailles), de couleur blanche et d'odeur caractéristique de goudron, détectable à de très faibles concentrations (de l'ordre de 0,1 ppm). Il se sublime à température ambiante en émettant des vapeurs.

Très faiblement soluble dans l'eau (de l'ordre de 30 mg/l), le naphtalène est soluble dans la plupart des solvants organiques (moyennement dans les alcools et le benzène et extrêmement dans l'éther et le tétrachlorure de carbone) [65-66].

Tableau 2 : Propriétés Physique de Naphtalène

Formule brut	$C_{10}H_8$
Masse molaire g/mol	128,16
Point de fusion	80,2-80,3 °C
Point d'ébullition	217,9 °C
Densité de vapeur (air = 1)	4,42
Point d'éclair en coupelle fermée	79 à 88 °C
Limites d'explosivité (% en volume dans l'air) limite inférieure limite supérieure	0,9 % 0.9% 5,9 %
Température d'auto-inflammation	526 à 587 °C

I.2.1.7. Dégradation des HAP

Les HAP peuvent subir différentes transformations dans l'environnement : la volatilisation, la dégradation photochimique, l'oxydation chimique et la biodégradation [67-68]. En parlant de ces transformat0ions, il faut noter que la volatilisation est associée au changement d'état des HAP, tandis que les autres transformations entraînent la modification de leur structure. Dans

un contexte d'élimination des HAP, les procédés intervenant peuvent être classés en deux groupes principaux : les procédés abiotiques de dégradation et la biodégradation.

I.2.1.7.1. Dégradation abiotique des HAP

Les transformations abiotiques n'impliquent pas les organismes vivants. Pour les HAP, les principaux procédés de dégradation abiotique dans l'environnement sont l'oxydation chimique et la dégradation photochimique [69-70].

a. Oxydation

L'oxydation est un processus chimique dans lequel une molécule déficiente en électron (oxydant) accepte des électrons d'un composé qui sera ainsi oxydé. Divers oxydants se retrouvent dans l'environnement en quantité suffisante pour réagir avec les molécules organiques. Ce sont les radicaux oxygénés, notamment hydroxyles (HO•), l'oxygène singulet ($^1O_2$) et l'ozone (O_3). La plupart d'entre eux peut être générée lors de transformations photochimiques naturelles ou par leur ajout en excès au cours des procédés de traitements des sols contaminées [71].

L'ozonation des HAP en solution (aqueuse ou mélanges eau/solvants) a été largement étudiée. Selon les conditions utilisées, les mécanismes d'ozonation directe (très sélectifs, notamment par rapport aux cycles aromatiques) ou indirecte par les radicaux hydroxyles (très réactifs mais non sélectifs) peuvent intervenir. Toutefois, les différentes réactivités de l'ozone pour les différentes molécules d'HAP n'ont pas été élucidées. Les travaux concernant l'ozonation des HAP en milieux solides (sédiments, sols) sont moins nombreux. Ils mettent en avant l'effet négatif de la présence de substances carbonées sur l'efficacité de l'ozonation des HAP et la nécessité d'appliquer des doses plus importantes qu'en solution. De plus, l'étape de désorption ou le transfert des HAP de la phase solide vers la phase aqueuse semble être le phénomène limitant.

b. Dégradation photochimique

La dégradation photochimique est une transformation chimique due aux interactions avec les rayons solaires. C'est un procédé de surface non négligeable [72]. Les HAP absorbent fortement le rayonnement ultraviolet (UV) et peuvent subir les réactions photochimiques telles que la photo-dimérisation et la photo-oxydation [73]. Il a été montré qu'une grande partie des HAP à poids moléculaire élevé est transformée dans l'eau sous l'action des rayons solaires, sachant que la vitesse de transformation augmente avec le poids moléculaire [74]. Généralement le taux de photodégradation augmente avec l'augmentation de température, la concentration en oxygène, l'illumination et le temps d'exposition [74-75-76].

Le mécanisme de la photo-oxydation des HAP n'est pas complètement élucidé. Il a été suggéré que dans l'eau la photolyse (la réaction dans laquelle un composé chimique est décomposé par la lumière) était le procédé photochimique primaire, et donc ne nécessitant pas d'oxygène [74] .Cependant, plus récemment [76] ont trouvé que la présence de l'oxygène était importante.

I.2.1.7.2. Biodégradation des HAP

Actuellement la biodégradation des HAP par les microorganismes est considérée comme la méthode principale d'élimination de ces polluants [68] L'objectif de la biodégradation des HAP est de les dégrader complètement et/ou de les transformer en produits moins nocifs. De telles biodégradations sont influencées par des facteurs liés aux microorganismes (nombre, capacités métaboliques, etc.), aux substrats (caractéristiques physico-chimiques, concentration, biodisponibilité) et à l'environnement (température, pH, etc.) [77].

Un grand nombre de bactéries, champignons et algues ont la capacité de dégrader les HAP. Ces biodégradations peuvent être faites soit par des souches pures, soit par des consortia de microorganismes [78]. Les champignons hydroxylent les HAP en vue de leur détoxification, tandis que les bactéries oxydent les HAP pour assimiler leur carbone. La dégradation des HAP peut être anaérobie ou aérobie, le dernier cas étant plus courant chez les bactéries [79]. Les genres suivants sont fréquemment utilisés dans le domaine de la biodégradation des HAP: *Pseudomonas, Rhodococcus, Mycobacterium, Sphingomonas, Burkholderia*. Les différentes voies de dégradation microbienne des HAP sont présentées sur la figure 7.

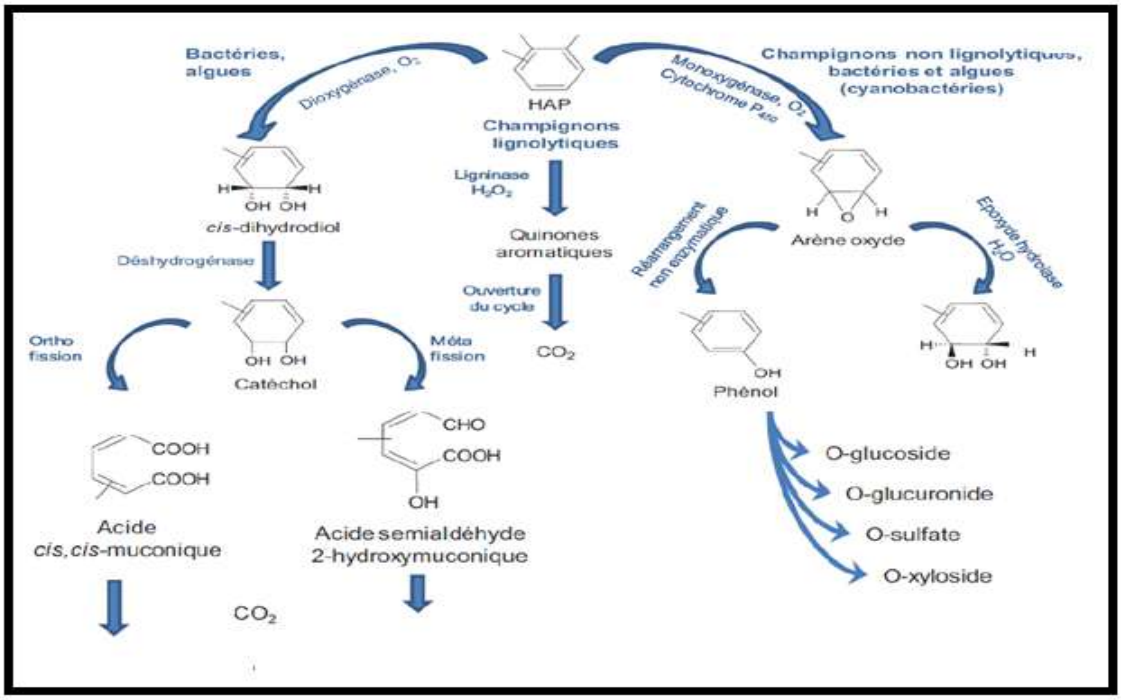


Figure7: Les différentes voies de dégradation microbienne des HAP [78]

I.2.1.7.2. 1. Dégradation par les bactéries

Plus de 75 genres de bactéries sont capables d'utiliser les HAP comme seule source de carbone et d'énergie [80] La biodégradation bactérienne aérobie des HAP commence généralement par l'action d'une dioxygénase (addition de deux atomes d'oxygène) qui « attaque » un des noyaux aromatiques pour former un *cis*-dihydrodiol. Celui-ci est ensuite déshydraté en catéchol (Fig. 7). Le catéchol est un produit intermédiaire à partir duquel peut avoir lieu l'ouverture du noyau aromatique. Cette ouverture se passe entre les deux groupements hydroxyles (ortho-fission) ou adjacente (méta-fission) et va conduire à la formation de composés simples (pyruvate, succinate) pouvant entrer dans le métabolisme centrale des bactéries. Cette biodégradation directe a lieu pour les HAP de faible poids moléculaire. En revanche, peu de bactéries sont capables d'utiliser les HAP de haut poids moléculaire comme unique source de carbone et d'énergie. Ainsi, la biodégradation des HAP de haut poids moléculaire se fait généralement par Co-métabolisme. Dans ce cas, les bactéries utilisent un substrat structurellement proche aux HAP de haut poids moléculaire (par exemple, un HAP de bas poids moléculaire) pour leur croissance.

Les enzymes non spécifiques produits sont alors impliquées dans la biodégradation des HAP de haut poids moléculaire [81].

Les métabolites ainsi formés peuvent être les produits finaux de dégradation, en particulier dans le cas de culture pure. Dans le cas des cultures mixtes, ces produits peuvent être dégradés par d'autres souches présentes. Enfin, quelques bactéries, comme *Mycobacterium*

sp. [82] sont aussi capables de dégrader les HAP par l'action de monooxygénases à cytochrome P450 pour former des trans-dihydrodiols (Fig.7) de façon similaire aux champignons non lignolytiques.

I.2.1.7.2. 2. Dégradation en conditions anaérobies

Les différentes voies de dégradation présentées jusqu'à présent faisaient intervenir des bactéries, des champignons et des algues en conditions aérobies. Ce n'est qu'à la fin des années 1990 que la capacité des microorganismes à dégrader les HAP en conditions anaérobies a été étudiée. En l'absence d'oxygène moléculaire, d'autres accepteurs d'électrons tels que les nitrates, le fer ferreux et les sulfates, sont nécessaires pour oxyder les HAP.

Des études relativement récentes ont montré que la dégradation des HAP pouvait avoir lieu dans des conditions anaérobies dénitrifiantes et sulfatoréductrices. L'oxydation de différents HAP dans des sédiments en conditions anaérobies sulfato-réductrices [83] et nitratoréductrices) [84] a ainsi été mise en évidence. A titre d'exemple, un mécanisme de la dégradation anaérobie du naphtalène a été proposé par [83]. Il commence par une étape de carboxylation suivie d'hydrogénations successives où l'eau serait la source de protons (Figure 8). Toutes ces études en milieu anaérobie suggèrent que le potentiel de dégradation anaérobie des HAP par les microorganismes pourrait être plus important que ce qui est admis jusqu'à présent et suggère une alternative intéressante aux traitements actuels de biorémédiation qui sont aérobies.

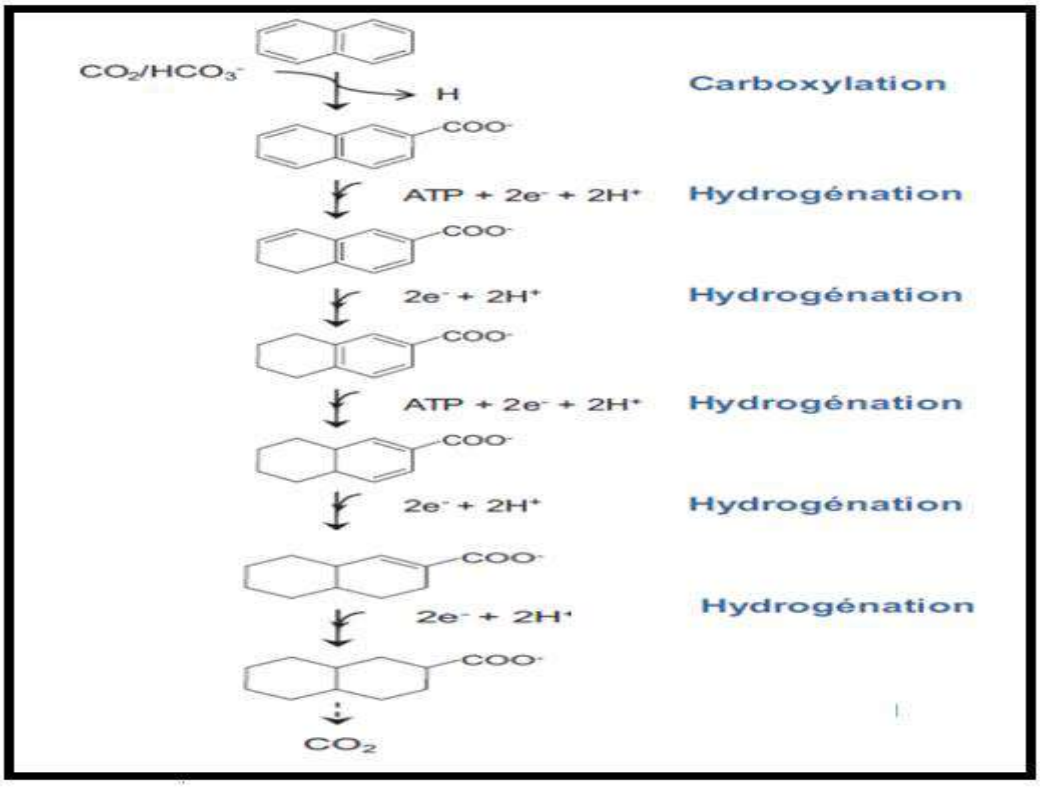


Figure 8: Dégradation anaérobie du naphtalène [83]

I.2.1.7.3. Dégradation des HAP en présence de tensioactifs

La faible solubilité aqueuse de la plupart des HAP est considérée comme un des principaux facteurs limitant leur dégradation. En effet, dans le cas des sols pollués, les HAP sont fortement adsorbés sur la matière organique et sont faiblement mobiles, ce qui diminue l'efficacité de certaines méthodes abiotiques de dégradation **[**85] Cependant, c'est surtout la biodégradation des HAP qui est restreinte par leur faible solubilité [86-87 -88].

De nombreuses études ont été menées afin de résoudre ce problème. Il a été ainsi déterminé que l'utilisation des tensioactifs en concentrations supérieures à un certain seuil, la concentration micellaire critique (CMC), permettait d'augmenter considérablement la solubilité des HAP. La CMC est une concentration à partir de laquelle les molécules des tensioactifs commencent à former des micelles (agrégats sphériques de 20 à 200 molécules d'environ 3-4 nm de diamètre) [89-90]. L'application des tensioactifs est également prometteuse du point de vue écologique et économique, car certains tensioactifs sont biodégradables, ou bien encore, il est envisageable de récupérer et réutiliser certains tensioactifs [91].

I.3. Généralité sur Les métaux lourds

b. Partie II

I.3.1. Définitions

Un métal est une matière, issue le plus souvent d'un minerai ou d'un autre métal, dotée d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, se combinant aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisables dans l'industrie. L'appellation « métaux lourds» est une nomination courante sans fondement scientifique ou juridique.

Ils peuvent se trouver dans l'eau, dans l'air et dans le sol mais généralement en quantités très faibles, c'est pour cela que l'on parle aussi d'éléments « traces ».

Ils sont la « trace» du passé géologique et de l'activité de l'homme. Ces métaux ne sont pas tous nécessaires à la vie et peuvent perturber le cours normal des processus métaboliques, même à l'état de traces. De tels métaux ont souvent un effet toxique. Le fait qu'un élément soit essentiel ou non dépend de sa participation ou non à des réactions biochimiques dans l'organisme. La solubilité de l'élément joue un rôle important pour son activité toxique réelle dans l'environnement [92] Les métaux existent dans la nature sous différentes formes: ions, complexes organiques ou inorganiques, en solution, absorbés sur des métalloïdes ou des aérosols [93] Dans l'organisme, les métaux lourds se trouvent le plus souvent dans les protéines, dont certaines servent comme enzyme, qui sont des biocatalyseurs du métabolisme [94].

I.3.2. Origine des métaux lourds

Les métaux lourds et métalloïdes sont présents de façon naturelle dans les sols car ils proviennent de l'altération de la roche-mère du sous-sol. L'extraction des minerais est une source importante de contamination des écosystèmes terrestres et aquatiques. Alors que les teneurs en nickel sont inférieures à 100 mg/kg dans la majorité des sols, les sols ultramafiques ou miniers de Nouvelle-Calédonie présentent des teneurs totales en nickel de l'ordre de 3 à 5 g/kg de sol [95-96].

Le stockage de déchets industriels miniers, de fonderies de métaux, les retombées atmosphériques des poussières des industries métallurgiques sont également des sources de contamination des sols par les métaux lourds. Les métaux lourds sont également présents dans les charbons destinés à la production du coke, combustible utilisé par les fonderies et les hauts fourneaux sidérurgiques. Le cadmium, le manganèse, le cobalt, le chrome, le cuivre, le plomb, le mercure, le nickel et le zinc sont les métaux lourds les plus fréquemment retrouvés à de fortes concentrations dans les sols de friches industrielles [97-98].

I.3.3. Comportement et devenir des métaux lourds dans les sols

La spéciation chimique des métaux lourds, c'est-à-dire leur répartition entre différents états d'oxydation ou de complexation, détermine principalement leur distribution dans les phases aqueuses ou solides du sol. Les propriétés physico-chimiques des sols telles que le pH, le potentiel d'oxydo-réduction influencent la spéciation des métaux lourds et conditionnent généralement leur solubilité, leur mobilité ainsi que leur toxicité vis-à-vis des organismes. Un pH acide favorise la mise en solution des sels métalliques et accroît leur toxicité. Le chrome sous sa forme hexavalente (CrVI) est plus mobile et toxique vis-à-vis des organismes que le chrome trivalent (CrIII).

La biodisponibilité et l'écotoxicité des métaux lourds dépendent également de leurs interactions avec les fractions organiques et/ou minérales du sol. Les minéraux argileux possèdent de grandes capacités d'échanges cationiques. Par adsorption, les argiles peuvent retenir une quantité importante de métaux lourds. Etant de bons adsorbants, les différents oxydes et hydroxydes métalliques présents dans les sols (fer, aluminium, manganèse…) jouent aussi un rôle important dans la rétention des ions métalliques. Les carbonates présents dans les sols peuvent également incorporer dans leur maille cristalline des cations métalliques, réduisant ainsi leur biodisponibilité et leur toxicité. De même que pour les HAP, la matière organique du sol peut adsorber efficacement par complexation les ions métalliques avec un haut degré de sélectivité. Il peut se former de fortes liaisons ioniques ou covalentes, réduisant la mobilité et la toxicité des métaux lourds. La force et la réversibilité de la liaison dépendent du ligand organique mis en jeu. Dans les sols, il existe de nombreux ligands organiques de type carboxylique, phénolique, carbonyle, capables de se lier aux métaux lourds [99].

La composition chimico-minéralogique du sol est un paramètre important qui va influencer la biodisponibilité et l'écotoxicité des métaux lourds. Ces éléments n'étant pas biodégradables, ils constituent des composés extrêmement stables dans l'environnement [100-101].

I.3.4. Effet sur l'environnement

Les métaux ont surtout un impact sur l'environnement. La contamination de la faune entraîne des problèmes de santé et conduit à un risque de bioaccumulation de métaux toxiques dans de nombreuses espèces aquatiques, y compris le poisson. Dans les sols arables, des concentrations élevées en métaux sont généralement associées à la présence d'eau souterraine contenant des métaux ainsi qu'à l'utilisation de certains engrais et produits chimiques agricoles. Dans des conditions extrêmes, les sols arables peuvent devenir impropres aux

cultures destinées à la consommation humaine, car ces cultures accumuleraient les métaux à des concentrations supérieures à celles considérées comme acceptables par l'Organisation Mondiale de la Santé OMS **[**102-103].

Dans cette partie on choisit le cuivre comme métaux lourd.

I.3.5. Le Cuivre

Elément chimique de numéro atomique Z = 29. C'est un métal rougeâtre, malléable et ductile, de conductivités thermique et électrique élevées. Il résiste à l'air et à l'eau mais se patine lentement en présence de carbonate. Il est présent dans la nature sous forme de minerais de cuivre natif, de minerais oxydés ou sulfurés. En métallurgie, il entre dans de nombreux alliages comme le laiton (cuivre et zinc), le bronze (cuivre et étain), le maillechort (cuivre, nickel et zinc). Ses propriétés de bon conducteur de la chaleur et de l'électricité en fond un matériau très utilisé. Les sels de cuivre (sulfate, acétate, dérivés organiques) sont utilisés comme fongicides ou algicides en agriculture, pour les traitements chimiques de surface, la fabrication de peintures et de céramiques.

Le cuivre peut se retrouver dans certaines eaux à des teneurs inférieures à 1 mg/L sous forme ionique ou de complexes (cyanures, ammoniaque, produits organiques, etc.). En dehors des pollutions industrielles ou de traitements agricoles, ce métal provient habituellement de la corrosion des tuyauteries de distribution [104].

I.3.5.1. Origine des contaminations

Le cuivre est un métal très employé dans les alliages, parmi lesquels le laiton (cuivre et zinc), le bronze (cuivre et étain), le maillechort (cuivre, zinc et nickel), et dans l'industrie électrique. Il est également répandu dans les réseaux de distribution du fait de sa résistance à la corrosion. Les sels de cuivre sont largement utilisés dans l'agriculture en tant qu'insecticides, fongicides, algicide, et dans l'industrie textile et photographique, la fabrication de pigments, les tanneries, les traitements de surface et la céramique. Les activités anthropiques constituent de ce fait la principale cause de pollution cuprique des eaux naturelles [104].

En dehors des pollutions industrielles ou du traitement agricole, ce métal provient habituellement de la corrosion des tuyauteries de distribution (0,5 à 1 mg/L), plus rarement il constitue le résidu d'un traitement des algues par les sels de cuivre. Du point de vue industriel, l'acide cyanhydrique et l'ammoniaque sont très agressifs pour le cuivre, car ils donnent naissances à des complexes très stables. Le premier se rencontre surtout dans l'industrie pétrolière; quant au second, il peut provenir de la décomposition thermique des amines utilisées pour la protection de certaines tuyauteries. Le cuivre est susceptible de

perturber l'épuration des eaux résiduaires par les boues activées, cela à des teneurs faibles (1 mg/L) et la digestion des boues avec des teneurs plus élevées (100 mg/L) [105-106].

I.3.5.2. Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques du cuivre sont données dans le tableau ci-dessous [107] :

Tableau3 : Propriétés chimiques du cuivre

Numéro atomique	29
Masse atomique	63.546 g/mol
Electronégativité de Pauling	1.9
Masse volumique	8,9 g/cm3 à 20°C
Température de fusion	1083°C
Température d'ébullition	2595°C

I.3.5.3. Effet du cuivre sur l'homme et l'environnement

Le cuivre est un métal nuisible pour l'environnement, il est plus toxique sous forme ionique que lorsqu'il précipite sous forme de carbonate (dans les eaux dures), alors que par ingestion, le cuivre métallique n'est pas toxique, ses sels minéraux et principalement les sels solubles, donnent des intoxications sévères, la mort pouvant survenir après l'ingestion de 10 g de sulfate de cuivre ou de 15 g d'hydrogénocarbonate de cuivre. Lors d'une exposition répétée, le cuivre entraîne des vomissements verdâtres, des douleurs abdominales, une diarrhée, une atteinte du rein et du foie.

L'intoxication chronique est marquée par un amaigrissement et des difficultés à la respiration. La présence d'une certaine quantité de cuivre dans l'eau potable peut donner à l'eau une saveur très désagréable pour des concentrations comprises entre 1-2 mg/L et rend l'eau non potable si la concentration dépasse 5 mg/L [108].

I.3.6. La biodégradation des métaux dans le sol

Il est bien connu que les cellules microbiennes puissent provoquer une chélation des métaux dans la solution. Il y a plusieurs rapports concernant l'utilisation d'exopolysacchaides pour chélation. Il a été rapporté que l'addition du biosurfactant peut favoriser la désorption des métaux lourds des sols de deux manières [109]:

- La première manière c'est par complexation de la forme libre du métal qui diminuera par la suite l'activité du métal en favorisant donc sa désorption.

- La seconde manière c'est lorsque la tension interfaciale est réduite, le biosurfactant s'accumule à l'interface solide–solution provoquant sa désorption du sol.

L'avantage des biosurfactant lors de bioremediation c'est que plus les éxopolymères ont un plus petit poids moléculaire, plus les agents de chélation chimiques sont biodégradables. Tan et al. [110**]** ont étudié le pouvoir du Rhamnolipide produit par *pseudomonas aeruginosa AT CC 9027* à enlever les métaux des sols contaminés avec le cadmium ; la complexation a été rapporté à 92% de Cd^{2+} dans une solution de 0.5mm de $Cd(NO_3)_2$ en utilisant une solution de 5 mM de rhammolipide. Cependant, il reste beaucoup à comprendre en ce qui concerne les mécanismes physiques d'interaction entre le biosurfactant et les métaux.

I.4. Conclusion

Les tensioactifs plus en plus utilisés dans divers domaines (agroalimentaire, pétrochimie, cosmétologie, médical….etc.). Ils sont en particulier utilisés dans la récupération tertiaire du pétrole et dans la bioremédiation des sols contaminés par des hydrocarbures ou par des métaux lourds, ainsi que dans la bioremédiation du milieu marin contaminé par le pétrole et ses dérivés. Les surfactants sont capables d'augmenter la solubilité des contaminants hydrophobes comme ils sont capables de favoriser la désorption des métaux lourds des sols.

CHAPITRE II

PARTIE EXPÉRIMENTALE

II.1. Introduction

Notre travail de rechercher a été réalisé au sein du laboratoire situé au niveau du hall technologique de l'Université DR.YAHIA FARES de MEDEA.

Il a pour objectif : la solubilisation d'un HAP modèle (Naphtalène) et désorption des métaux lourds (cuivre) par les tensioactifs Natural et synthétique.

II.2. Matériel

II.2.1. Matériel non biologique

Les listes de matériel et des produits utilisés sont présentées respectivement dans les annexes A1 et A2, Les produits sont décrits par leurs structures chimiques, leurs degrés de pureté ainsi que leurs origines.

II.2.2 Matériel biologique

Notre étude porte sur une souche bactérienne (bacille gram positif) : *Bacillus Licheniformis,* elle a été isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud, sud d'Algérie, sa conservation se fait par congélation, un repiquage chaque mois est nécessaire afin de garder son activité et même pour réaliser les différentes cultures durant la période de notre travail.

II.3. Méthode

II.3.1. Conditions de culture

L'espèce bactérienne utilisée pour la production est la souche isolée du sol, identifiée précédemment a été maintenu dans des boites de pétri contenant de soja triptona (TSA), Agar. Ils sont recultivés tous les mois et conservés à (4°C).

Pour la préparation de l'inoculum, 50 ml d'une préculture a été utilisée avec une concentration de 8 g/l.

La préculture contient (en g/l):

Extrait de carne .....3.

Peptone de gélatine .....5.

Avec pH = 6.8 • } 0.2

Les croissent dans ce milieu pendent 18 h a température 25°C. Ce dernier été utilise comme inoculum a 8 % (v/v) puis développe dans un milieu de culture minéral contenant (en g/l):

- Na_2HPO_4 (2.2), - $MgSO_4.7H_2O$ (0.06), - Na Cl (0.05), $CaCl_2$ (0.02),

- KH_2PO_4 (1.4), - $FeSO_4$.$7H_2O$ (0.01), - Extrait de levure (0.02),

On a 1 ml d'une solution d'oligoélément composes de (en mg/l):

- $ZnSO_4.H_2O$ (525), - $MnSO_4$.$4H_2O$ (200), - $CuSO_4.5H_2O$ (200),
- $NiSO_4.6H_2O$ (27), - $CoCl_2$.$6H_2O$ (200), - H_3BO_3 (15).

La bactérie a été développé dans des erlenmeyers de 250ml, (Figure 9) contenant 50ml de milieu de culture stérilise par l'autoclave a (121C°, 1 atm) pendent 20 min. ils sont incubes 48 h sur un agitateur orbitale a 200 tr/min et a température 45 C°.



Figure 09 : incubateur shaker

II.3.2. Tension superficielle (*Y*)

La tension de surface est définie comme étant un état résultant des interactions s'exerçant entre les molécules à la surface d'un liquide au repos. Cette tension provient des forces intermoléculaires qui exercent une traction vers le bas sur les différentes molécules en surface.

La mesure de la tension superficielle est réalisée par la méthode de l'arrachement d'anneau en platine à l'aide d'un tensiomètre (figure 10).

Le milieu de production est centrifuge à 6000 tr/min pendant 20 min, afin de séparer la biomasse. Le surnageant sépare est le liquide employé pour mesurer la tension superficielle Apres l'incubation de notre production pendant 48 h.

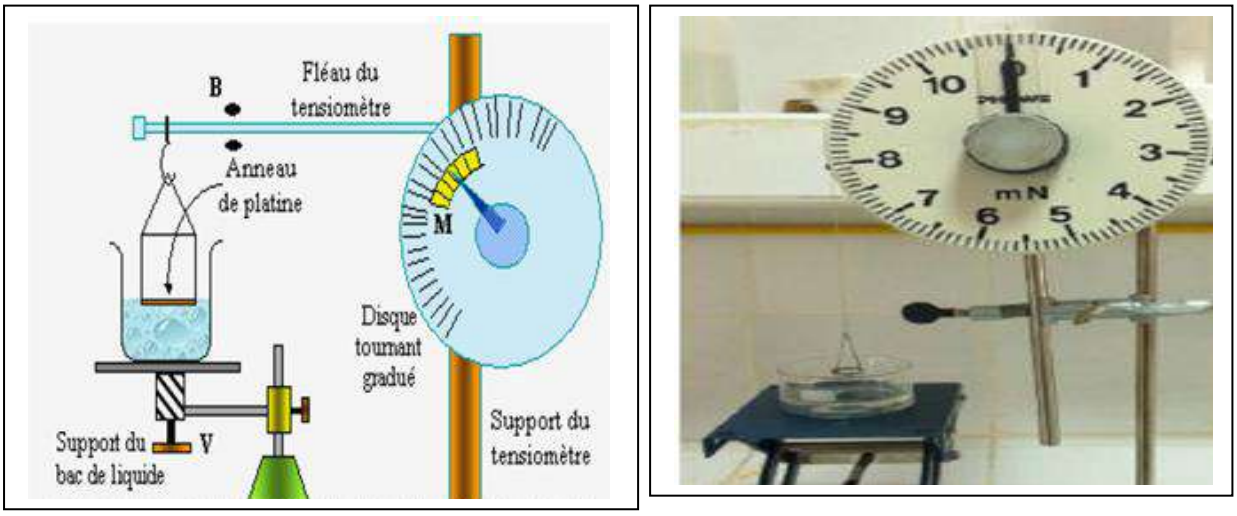


Figure 10 : Tensiomètre a anneau **(B** : butées du fléau ; **V** : vis sans fin permettant le déplacement vertical de l'échantillon ; **M** : système de vernier pour une lecture fine de la

II.3.3. Optimisation des paramètres opératoires :

La source de carbone utilisée est : le gasoil à une concentration de 2% et avec nitrate de chlore (NH4Cl) 0.02 g comme source d'azote, donne une bonne production de biosurfactant en présence de la souche ***Bacillus licheniformis*** [111].

II.3.4. Extraction de biosurfactant

Le biosurfactant est précipite par acétone, en ajoutant au surnageant a trois volume égale d'acétone dans un bain marie glace (figure 11), on laisse 24h a 4°C et on centrifuge (200tr/min).

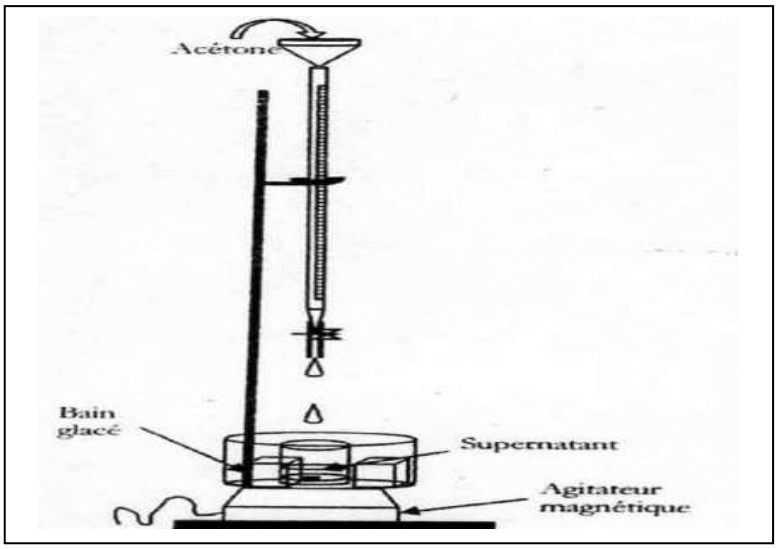


Figure 11 : Extraction de biosurfactant par l'acétone

Le biosurfactant obtenu est sèche dans une étuve a 30 °C, Le rendement de production des biosurfactants a été également détermine.

II.3.5. Application environnementale des tensioactifs

a. Partie I :

II.3.5.1. Solubilisation d'hydrocarbures

II.3.5.1.1. Solubilisation du Naphtalène

-Test à blanc : dans une fiole de 100 ml on Prépare une solution du Naphtalène a concentration 30mg /ml à 25°C [112] dans l'eau.

-Test avec les tensioactifs

- **Avec le biosurfactant**

Une solution de 10ml de biosurfactant à concentration supérieure à la concentration micellaire critique (CMC) (10 mg/ml) est préparée à température ambiante à laquelle on a ajouté une quantité de Naphtalène pour atteindre une concentration de 30mg/l, la solution est maintenue en agitation 24h. Suivi d'un temps de repos de 2h, Elle est ensuite filtrée.

- **Avec SDS et Tween 80 :** à une solution de 100ml de SDS et Tween 80 qui ont une concentration micellaire critique (CMC) respectivement de 8.10^{-3}mol /L et$1.2.10^{-5}$ mol/l [113] on ajouté la même quantité de Naphtalène, la solution est maintenue en agitation puis laissée reposer pendant 2h.

Pour chaque test on estime à l'aide d'une analyse spectrophotométrique UV-Visible la longueur d'onde maximale par la variation de la longueur d'onde dans l'intervalle suivant: [254 à 290 nm] avec un pas 4 nm.

b. Partie II :

II.3.5.2. Désorption de cuivre par les tensioactifs

❖ **Mode opératoire**

- On prépare Une solution de sulfate de cuivre à (0.1N) dans l'eau.
- domaine d'étude : 500-1000nm.
- Déterminer λ max pour une adsorption maximale.
- Pour tracer la courbe d'étalonnage, on a préparé 6 solutions aqueuses de sulfate de cuivre dont les concentrations (en g /l) sont : 2 /1/0.5/0.25/0.125/0.0625,par la dilution à partir d'une solution mère de sulfate de cuivre à concentration 24.96g/l.

On applique loi d'équilibre : C1V1= C2V2

-Test à blanc

Mettre dans un erlenmeyers de 250ml 1g de charbon actif, et on lui ajoute une solution de sulfate de cuivre à (0.1N) dans 200 ml d'eau distillée. La solution est maintenue sous l'agitation pendant 24h, à température ambiante. Ensuite on filtre la solution. Et on suit l'estimation par analyse spectrophotométrique UV Visible, avec un séchage de charbon actif dans l'étuve.

-Test avec les tensioactifs

Le charbon actif sec a été utilisé avec l'ajout de différentes solutions des tensioactifs.

Une solution de 20 ml de SDS, biosurfactants et 100ml de tween 80 à différentes concentrations (au-delà CMC) 5g/L pour SDS et 4mg/ml pour biosurfactants ; 20mg/l pour Tween 80, le même protocole pour test a blanc [114].

-Pour chaque test on calcul la concentration par la loi de Beer-Lambert et on calcule le pourcentage de récupération on applique loi suivante :

$$\% \textbf{ de récupération} = \frac{\textbf{m désorption } \times \textbf{100}}{\textbf{m adsorbée}}$$

Tel que :

-masse désorption égale la concentration finale multipliée par le volume de solution :

- $\textbf{m désorptions} = \textbf{C}_{\textbf{f}} \times \textbf{V} = (\textbf{DO}_{\textbf{f}})/\textbf{pente} \times \textbf{V}$

-masse adsorbée égale la concentration initiale (à temps égale zéro) moins la concentration finale (après 24) multipliée par volume de solution :

- $\textbf{m adsorbée} = (\textbf{C}_{\textbf{0}} - \textbf{C}_{\textbf{f}}) \times \textbf{V}$

II.4. Résultats et discussions

II.4.1. Mesure La tension superficielle de biosurfactant

On applique la loi : $\gamma = \frac{f}{2L}$

$$\gamma = \frac{4}{2 \times 6 \times 100} = 33.33 \text{ mN/m}$$

II.4.2. Extraction de biosurfactant

La méthode de séparation a donné un rendement de 1.5g/l de biosurfactant. Le Précipite obtenu est une poudre blanche cristalline soluble dans l'eau distillée.

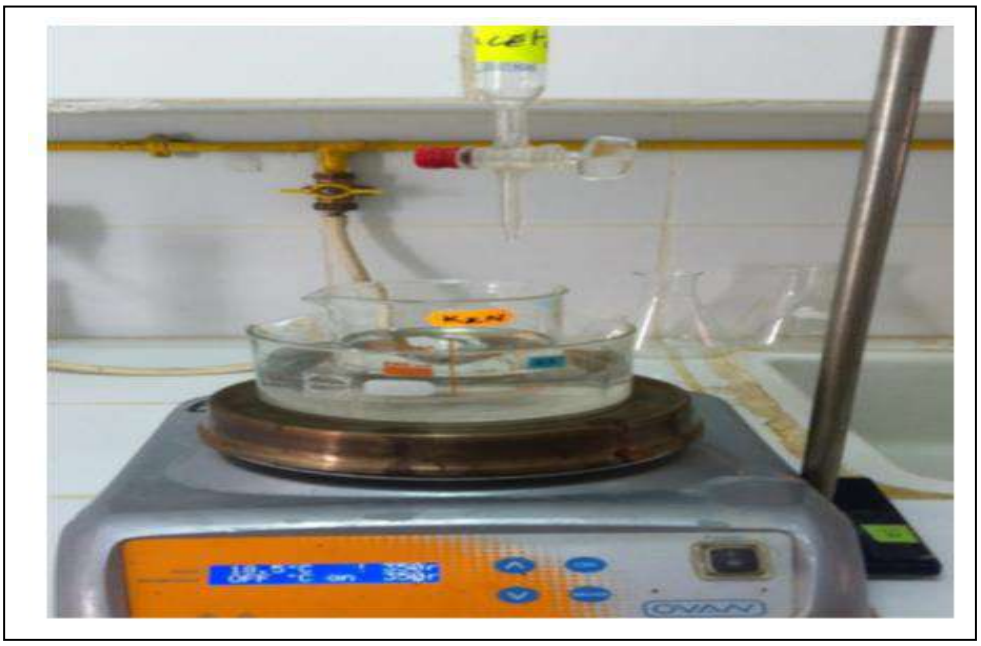


Figure 12: Mécanisme d'extraction de biosurfactant par acétone

II.4.3. Applications environnementales

II.4.3.1. Solubilisation du naphtalène

En ajoutant à une solution du Naphtalène, une quantité de tensioactifs à différentes concentrations.

Tableau4 : densité optique des tensioactifs en fonction de la longueur d'onde

λ (nm)	DO (Naph)	DO (biosurfactant)	DO(SDS)	DO (Tween 80)
254	0.015	0.121	0.07	0.091
258	0.028	0.092	0.059	0.07
262	0.016	0.086	0.073	0.068
266	0.039	0.12	0.06	0.109
270	0.034	0.107	0.059	0.062
274	0.024	0.103	0.048	0.09
278	0.034	0.103	0.045	0.048
282	0.053	0.136	0.128	0.119
286	0.237	0.339	0.489	0.468
287	0.248	0.381	0.589	0.559
290	0.159	0.305	0.403	0.38

La solubilité du naphtalène a été vérifiée par analyse spectrophotométrie UV Visible, en ajoutant à une solution du Naphtalène, une quantité de biosurfactant à 10mg/ml, SDS à 8.10^{-3} mol/l, Tween 80 à $1.2.10^{-5}$ mol /l. Les résultats obtenus sont ceux montrés sur la (figure 13) ou l'on représente les variations des spectres sans tensioactifs et avec tensioactifs en fonction de la longueur d'onde.

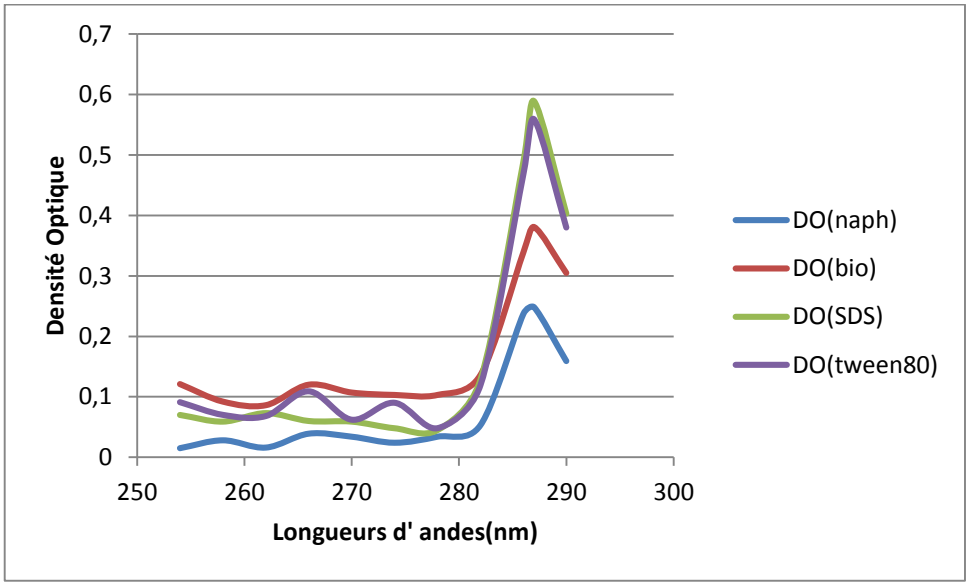


Figure 13 : Solubilisation du Naphtalène par les tensioactifs

L'analyse de cette figure, montre que le niveau de la solubilisation du Naphtalène a augmenté après l'ajout des tensioactifs. Les résultats obtenus confirment la solubilité du Naphtalène allant d'une longueur d'onde maximale 287 ± 1nm.

Par ailleurs plusieurs recherches sur la solubilité des hydrocarbures aromatiques par les biosurfactants ont été réalisées [115]. Les biosurfactants produits par *pseudomonas sp* sont capables de solubiliser plus de naphtalène à un pH neutre, que le SDS et le Triton [116].

Il a été montré que la concentration du biosurfactant au-dessous de CMC aucun changement considérable dans solubilité du naphtalène se produite après l'addition de biosurfactant par rapport à sa solubilité dans l'eau à la même température (25-30mg /ml). Au-dessus de la CMC, le biotensioactif est efficace dans l'amélioration de la solubilité du naphtalène, donc la solubilité de naphtalène est proportionnelle à la concentration du biosurfactant [9].

L'ordre croissant des valeurs de la CMC du tween 80 et inferieur que celle du SDS. En général, plus les valeurs de la CMC sont inferieurs plus est haut l'efficacité de la solubilisation

du surfactants. Ici, tous les surfactants synthétiques étudiés suivent la règle de CMC. Par conséquent il est rapporté que les surfactants non ioniques solubilisent mieux Le naphtalène que les surfactants ioniques [117].

II.4.3.2. Désorption de cuivre par les tensioactifs

Après la préparation de solution on détermine la longueur d'onde maximale.

- La valeur de λ max trouvée : 810nm.
- Tracer La courbe d'étalonnage ABS=f (concentration).
  - ❖ d'après la mesure d'absorbance à 810nm on peut tracer la courbe d'étalonnage.

Tableau 5 : représente la densité d'absorption en fonction de la concentration

C (g/l)	0	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
DO	0	0.091	0.044	0.022	0.011	0.005	0.002

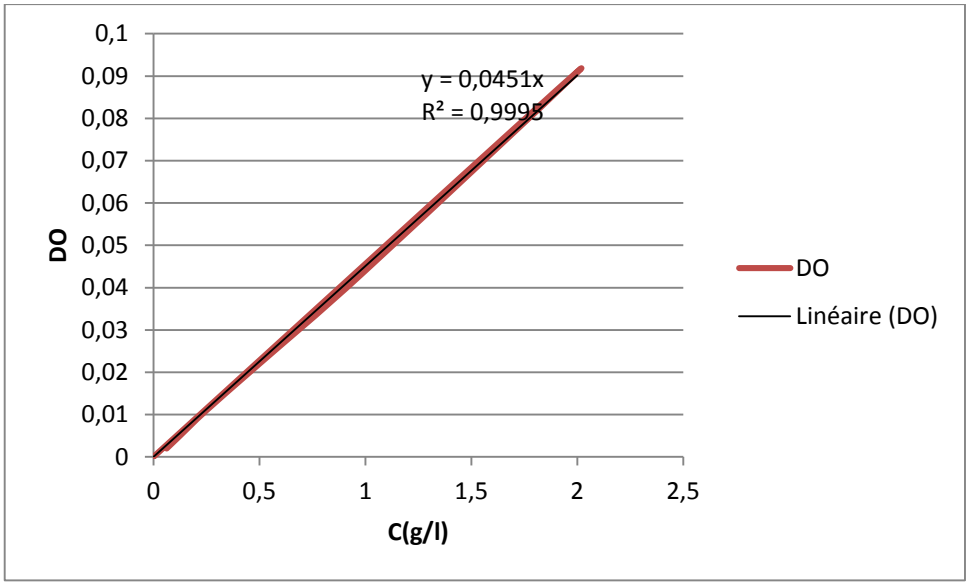


Figure14 : la densité optique en fonction de la concentration

D'après le graphe on obtenir ligne droite qui passe par l'origine de l'équation Y= α x

Tel que : Y : la densité d'absorption

X : la concentration de solutions préparées

α : tg a

D'après la courbe d'étalonnage

α =tg a=0.0451

❖ Calcule les concentrations des solutions pour chaque test

➢ **Test à blanc**

-Calcul la concentration initial et la concentration finale

On applique la loi de Beer-Lambert

DO = ε l c

D'après la courbe d'étalonnage

Y= α x ……. (1) graphiquement

DO = ε l c …..(2) théoriquement

Après la comparaison les deux équations

ε l =0.0451 Alors DO=0.0451c

Avec DO initial égal a 1.368

C_i= DO/Pente

Donc la concentration initiale égale : **C_i = 30.33g/l**

- Et Avec DO finale égale à 1.203

Donc la concentration finale égale : **C_f = 26.67g/l**

➢ **Test avec les tensioactifs**

-Avec la biosurfactant

Calcul la concentration finale de cette solution.

C_f = DO/Pente

Donc : **C_f = 1.82 g/l**

-Avec SDS

La concentration finale de cette solution est un : **C_f =1.46 g/l**

-Avec Tween 80

La concentration finale de cette solution est un : **C_f = 0.67 g/l**

❖ **calcule les pourcentages de récupération pour chaque test**

-le pourcentage de récupération est calculé selon la formule suivante :

% de récupération =(m désorption ×100)/(m adsorbée)

Tableau 6 : Pourcentages de récupérations de cuivre par les différents tensioactifs.

Les tensioactifs	**Pourcentages de récupérations (%)**
Biosurfactant	49.73
SDS	39.89
Tween 80	18.30

Après les calculs des pourcentages des récupérations on conclue que le meilleur résultat est la Biosurfactant à **49.73%,** parce que les tensioactifs Natural ont des avantages biodégradables et non toxique par contre dans les tensioactifs synthétiques [3].

II.5. Conclusion

Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), présentent un risque toxicologique important même à de faibles concentrations, notamment par leurs propriétés cancérigènes et mutagènes. Du fait de leur forte hydrophobicité liée à la présence de noyaux aromatiques, ces molécules s'adsorbent fortement aux matières particulaires rendant leur élimination difficile. De plus, ces hydrocarbures sont peu biodégradables car faiblement biodisponibles, ce qui les rend persistants dans l'environnement.

La pollution simultanée aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et aux métaux lourds a plus particulièrement attiré l'attention du publique, ainsi que de la communauté scientifique. Ces deux types de Contaminants coexistent en effet fréquemment sur des sols pollués de friches industrielles.

Les résultats obtenus confirment le pouvoir solubilisant du surfactant sur le naphtalène ainsi la désorption du cuivre. Ainsi les applications et les études pourraient être envisageables avec les tensioactifs obtenus dans le domaine de la bioremediation des sols et pour la récupération du pétrole.

Dans ce travail, on a étudié la solubilisation d'un hydrocarbure polycyclique (naphtalène) et la désorption des métaux lourds (cuivre) par les le biosurfactant, dodécyl sulfate de sodium (SDS) et tween 80.

Les microorganismes choisis dans ce travail sont souche bactérienne (bacillus licheniformis) pour la production de biosurfactant pour l'utilisation dans cette étude et la mesure de la tension superficielle 33.33 mN/m.

Dans la première partie de cette étude, on a évalué l'efficacité du biosurfactant, dodécyl sulfate de sodium(SDS) et tween 80 à solubilisation certains hydrocarbures peu solubles dans l'eau tels que les polyaromatiques (cas du naphtalène). Les essais ont montré qu'à partir de la concentration micellaire critique (CMC), la décontamination est réalisée.

Les résultats expérimentaux montrent que la solubilisation de naphtalène a augmenté en présence des tensioactifs.

Il a été montré que la concentration du biosurfactant au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC), le biotensioactif est efficace dans l'amélioration de la solubilité du naphtalène, donc la solubilité de naphtalène est proportionnelle à la concentration du biosurfactant.

Au-dessous de la CMC, le biosurfactant existe principalement sous forme de monomères et ne contribuait pas à la solubilité du naphtalène, tandis qu'au-dessus la CMC les micelles des agents tensioactifs ajoutés formées (un agrégat transitoire de molécules tensioactives) et par conséquent amélioré la solubilité.

Tous les surfactants synthétiques étudiés suivent la règle de CMC. Par conséquent il est rapporté que le surfactant non ionique (tween 80) solubiliser mieux le naphtalène que le surfactant ionique (dodécyl sulfate de sodium).

Dans la seconde partie de l'étude, la désorption de cuivre par biosurfactant, dodécyl sulfate de sodium (SDS) et tween 80, en utilisant concentration supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). Après les calculs des pourcentages de récupérations on montré que le biosurfactant à 49.73% est le meilleur résultat de le dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 39.89% et Tween 80 à 18.30%.

Et à la fin nous disons que les surfactants sont capables d'augmenter la solubilité des contaminants hydrophobes comme ils sont capables de favoriser la désorption des métaux lourds des sols.

[1] Noiret N., Benvegnu T. and Plusquellec D. (2002). Surfactants from renewable resources. Actualite Chimique. 11-12:70.

[2] Vipulanandan C. et X. Ren (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant, Journal of Environmental Engineering, 126 (7): 629-634.

[3] Banat I., (2000). Les biosurfactants plus que jamais sollicités. Biofutur ; mensuel Européen de biotechnologie, 198 :40-46.

[4] Dahnoun Nouria (2013). Evaluation du taux de contamination par HAP de la faune aux alentours d'un centre a risques. Mémoire de Master : Spécialité : Chimie physique et analytique. Université Abou Bakr Belkaid–Tlemcen.

[5] Christophe Barnier (2009). Disponibilité des HAP dans les sols de friches industrielles et influence des conditions rhizosphériques. Thèse de doctorat : Spécialité : Sciences Agronomiques. Université Nancy.

[6] ATSDR. (1995). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Atlanta GA: Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 487 pp.

[7] Mackay, R.A., (1987). Solubilization in Nonionic Surfactants: Physical Chemistry, Schick, MJ. Ed., Marcel Dekker, New York, p. 297.

[8] Loic Kernen et Romain Cintrat (2011). Tensioactifs et Agrégats en solution.
Mémoire de Licence : Spécialité : Chimie des Matériaux Organiques et Métalliques. Université Nice Sophia Antipolis.

[9] Edwards, D. A., R. G. Luthy, and Z. Liu. (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. Environ. Sci. Technol. **25:**127–133.

[**10] Sobisch, T., Hess, H., Niebelschutz, H., Schmidt, U., (2000).** Effect of additives on biodegradation of PAH in soils. Colloid Surf.162, 1–14.

[11] Garrett, H.E. (1972). Surface active chemicals, Pergamon Press, Dekker, New York, NY.

[12]Clint, J.H. (1992). Surfactant Aggregation, Blackie (Glasgow and London), Chapman and Hall, New York, NY.

[13] Belhadj Mama (2013). Structure et interactions d'un système micellaire non ionique fluore par diffusion de neutrons aux petits angles. Mémoire de Magister : Spécialité : Chimie Physique. Université d'Oran.

[14] Chahrazed Ghezouali (2010). Interactions des polyélectrolytes complexes tensioactifs. Mémoire de Magister : Spécialité : Chimie et Physico-chimie Organique Macromoléculaires. Université de Abou Bakr Belkaid- Tlemcen.

[15] Cristel Onesippe (2005). Etude des systèmes poly électrolyte / tensioactif en phase aqueuse et à l'interface liquide / gaz. Application à l'élaboration de micro – capsules.
Thèse de doctorat : Spécialité : Chimie et Physique. Université de Montpellier II.

[16] Healy, M.G., Devine C.M. et Murphy R., (1996), Microbial production of biosurfactants. Resources, Conservation and Recycling, 18: 41 57.

[17] Ron E.Z. et Rosenberg E., (2002), Biosurfactants and oil remediation. Current Opinion in Biotechnology, 3: 249-252.

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

[19]Van-Dyke, M.I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee and J.T. Trevors ,(1993). Pseudomonas aeruginosa UG2 rhamnolipid biosurfactants: Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol., 39: 1071-1078.

[20] Vinogradov ,M.E.(1981). Ecosystems of equatorial upwellings. In :Analysis of Marine Ecosystems (Ed. by A.R. Longhurst),pp.69-93.Academic Press, London.

[21] Schwartz A. M. et Perry j. w. (1977). Surface Active Agents and Detergents, Knieger R.E. publishing company, New York.

[22] Poré j. (1992) . Emulsions, microémulsions, émulsions multiples, Ed Techniques des industries des corps gras. Neuilly, PP: 20-75.

[23] Barathi S. et Vasudevan N., (2001). Utilization of hydrocarbons by Pseudomonas fluorescenesisolated from a petroleum-contaminated soil. Environ. Inst. **26**: 413-416.

[24] Shinoda. K et Fontell. K, (1995). Ionic surfactants capable of being used in hard water. Advances in Colloid and Interface Science, 54, 55-75.

[25] Sisley, j. P. (1947) . Savons et détergents synthétiques .O lagineux N° 7 jeuillet PP.35.

[26] Bognolo G. (1999), Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects, 152: 41-52.

[27] Lang S. et Wullbrandt D, (1999). Rhamnose lipids biosynthesis – Microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 22-32.

[28] Makkar R.S. et Cameotra S.S, (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbiol Biotechnol., 58, 428-434.

[29] Mercade M.E. et ManresaM.A, (1994). The use of agroindustrial by-products for Biosurfactant production. *J.A.O.C.S.*, 71, (1), 61-64.

[30] Mulligan C.N, (2005). Environmental application for biosurfactants. Environ. Pollut. 133 (2), 183-198.

[31] Fiechter A, (1992). Biosurfactants, moving towards industrial application. Tibtech,Vol. 10: 208-217.

[32] Mata-Sandoval. J.C, Karns. J. et Torrents. A, (2000). Effect of rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa UG2* on the solubilization of pesticides. *Environ. Sci. Technol.*, 34, (23), 4923-4930.

[33] Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., Garcı´a, F., & Manresa, A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa AT10 from soybean oil refinery wastes. Langmuir, 17(5), 1367-1371.

[34] Banat. M., Makkar. R.S. et Cameotra. S.S, (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 53, 495-508.

[35] Thangamani S. et Shreve G. S., (1994). Effect of anionic biosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems, *Environ. Sci. Technol.*, 28 (12): 1993-2000.

[36] Desai J. D., Banat I. M., (1997). Microbial Production of Surfactants and their commercialpotential, *microbiol. And mol. Biol. Reviews*, Vol. 61, No. 1, p. 47–64.

[37] Cameotra S. S. et Makkar R. S., (1998). Synthesis of biosurfactants in extremeconditions, Appl. Microbiol. Biotechnol., 50 : 520-529.

[38] Jung, H.K., Lee, J.B., Yim, G.B., Kim, E.K., (1995). Properties of microbial surfactant Sacid. Korea Journal of Biotechnology and Bioengineering 10, 71-77.

[39] Gabet S., (2004). Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'universite de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau, p. 177.

[40] Arino S., Marchal R. et Vandecasteele J.P., (1996). Identification and production of rhamnolipidicbiosurfactant by a *Pseudomonas* species, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45 : 162-168.

[41] Guerra-Santos L. H., Kappeli O. et FiechTer A., (1986). Dependence of *Pseudomonas* aeruginosacontonuous culture biosurfactant production on nutritional and environmentalfactors. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24 : 443-448.

[42] Laith, A; Raja Noor Zaliha, R; Mahiran, B, Abu Baker; S,. (2007) . Microbial Surfactant, Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, Malaisie, P 99, 101, 102.

[43] Virginie Neto, (2007). Nouvelles méthodes d'élaboration de tensioactifs glycosylés par métathése croisée et cycloaddition 1,3-dipolaire. Thèse de doctorat : Spécialité: Chimie Appliquée – Chimie des Substances Naturelles. Université d' Limoges.

[44] Nemiche Nardjesse, (2013). Synthèse et Caractérisation de Copolymères Amphiphiles à Blocs.thèse de doctorat : Spécialité : Chimie-Physique. Université d'Oran.

[45] Amal BenhathaT, (2006). Synthèse des tensioactifs de la classe des imidazolines. Mémoire de Magister : Spécialité : Pétrochimie. Université M'hamed Bougara de Boumerdes.

[46] Franennec J. P., Leprince P., Trembouze P. et Favennec J. P., (1998). Le raffinage de pétrole : Pétrole brut-produits pétrolier-schéma de fabrication, Tome 1. Technip.

[47] Bocard C.,(2006). Marrées noires et sols pollués par les hydrocarbures et traitement des pollutions. Technip, p. 12.

[48] Soltani M., (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique, p. 284.

[49] Menzie C A, Pptocki B et Santodonato J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment, Environ. Sci. Technol., 26, (7), 1278-1284.

[50] Li j et Chen B H, (2002). Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants, *Chemical Engineering Science*, 57, (14), 2825-2835.

[51] Aitken, M. D., Grimberg, S. J., Nagel, J., Nagel, R. D., Stringfellow, W. T., (1996). Bacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and potential effects of surfactants on PAH bioavailability. Water Resources Research Institute of the University of North Carolina, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, p.82.

[52] EPA. (1979). Criteria for classification of solid waste disposal facilities and practices. U.S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations. 40 CFR 257.

[53] WilckeW, (2000). SYNOPSIS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil - a Review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163(3) p.229-248.

[54] Neff J M. (1979). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: source, fat and biological effect. Applied Science, Essex, England, pp. 262.

[55] Boukherissa M. (2008). Etude de la stabilité des asphaltènes dans le pétrole brut Choix de dispersants et le mécanisme d'action. Thèse de doctorat de l'Université Paul Verlaine – Metz.

[56] Loi Canadiène sur la Protection de l'Environnement (LCPE) , (1994).Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation, Hydrocarbures aromatiques polycycliques, N° de catalogue En 40-215/42F Edition, Ministre des approvisionnements et services, Canada,

[57] Ballerini D, Gatellier C, Vogel T. (1998). Techniques de traitement par voie biologique. ADEME Editions. Angers. 247p.

[58] Murry J Mc. (2000). .Chimie organique, les grands principes. Editions DUNOD, Paris.

[59] Samanta S K et al, (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation – review, Trends in Biotechnology, 20, (6), 243- 248.

[60] Liu, L., Tindall, J. et Friedel, M. (2007). Biodegradation of PAHs and PCBs in Soils and Sludges. Water, Air, & Soil Pollution 181(1) p.281-296.

[61] Haritash A K et Kaushik C P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials 169(1-3) p.1-15

[62] Ineris., (2005).“Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: Naphtalène**’’**. Version n° 3-2, Site web: http://www.ineris.fr.

[63] INRS. , (2007). “Fiche toxicologique FT 204. Naphtalène**’’**. http://www.inrs.fr/htm/naphtalene.html.

[64] ATSDR. (2003). "Toxicological profile for naphthalene, U.S Department of Health and Human Services". Atlanta, http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp67.html

[65] Naphthalene European Union Risk Assessment European Chemicals Bureau; **(2003).**consultable sur le site http:// ecb .jrcit/.

[66] IUCLID Dataset. Naphthalene pure CASn° 91-20-3. European Commission. European Chemicals Bureau; 2000. Consultable sur le site http:// ecb .jrcit/.

[67] Wild, S.R., Jones, K.C., (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. Environ. Pollut. 88, 91–108.

[68] Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E. (1999). Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2697-2702.

[69] Kochany, J., Maguire, R.J., (1994). Abiotic transformations of polynuclear aromatic hydrocarbons and polynuclear aromatic nitrogen heterocycles in aquatic environments. Sci. Total Environ. 144, 17-31.

[70] Lundstedt, S., (2003). Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. Department of Chemistry Environmental Chemistry. Umea (Suède), Umea University, p. 56.

[71] Sijm, D.T.H.M., Rikken, M.G.J., Rorije, E., Traas, T.P., McLachlan, M.S., Peijnenburg, W.J.G.M., (2007). Transport accumulation and transformation processes. In: van Leeuwen, C.J., T.G. Vermeire (eds.). Risk assessment of chemicals: an introduction. Dordrecht, Springer, pp. 73-158.

[72] Mackay D., and Shiu W.Y,. (1977). Aqueous solubility of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons J. Chem. Eng., vol. 22, n°4, pp. 399-402.

[73] Clark, R.B., (2001). Marine pollution. 5th ed., reprinted in 2002. Oxford University Press, Oxford, p. 236.

[74] Zepp, R.G., Schlotzhauer, P.F.,(1979). Photoreactivity of selected aromatic hydrocarbons in water. In: Jones, P.W., Leber, P. (eds.) Polynuclear aromatic hydrocarbons. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI, pp. 141–158.

[75] Mill, T., Mabey, W.R., Lan, B.Y., Baraze, A., (1981). Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. Chemosphere 10, 1281–1290

[76] Sigman, M.E., Schuler, P.F., Ghosh, M.M., Dabestani, R.T., (1998). Mechanism of pyrene photochemical oxidation in aqueous and surfactant solutions. Environ. Sci. Technol. 32, 3980-3985.

[77] Boopathy, R., (2000). Factors limiting bioremediation technologies. Biores. Technol. 74, 63-67.

[78] Cerniglia,C.E.,(1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3, 351-368.

[79] Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B.V., (2000). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. Chemosphere 41, 1463-1468.

[80] Olliver, B., Magot, M. (eds), (2005). Petroleum microbiology. ASM Press, Washington, DC, 318-320.

[81] Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environ. Pollut. 133, 71-84.

[82] Kelley, I., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E., (1990). Indentification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. Biodegradation 1, 283-290.

[83] Zhang, W., Wang, Z., Li, W., Zhuang, B., Qi, H., (2008). Production of L-phenylacetylcarbinol by microbial transformation in polyethylene glycol-induced cloud point system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78, 233–239.

[84] Rodriguez Nino, M.R., Rodriguez Patino, J.M.R., (1998). Surface tension of protein and insoluble lipids at the air-aqeuous phase interphase. J. Am. Oil Chem. Soc. 75, 1233-1239.

[85] Hatzinger, P.B., Alexander, M., (1995). Effect of aging on chemicals in soil on their biodegradability and extractability. Environ. Sci. Technol. 29, 537–545.

[86] Wodzinski, R.S., Coyle, J. E., (1974). Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. Applied Microbiol. 27, 1081-1084.

[87] Guha, S., Jaffé, P., (1996). Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. Environ. Sci. Technol. 30, 605-611.

[88] Bamforth, S.M., Singleton, I., (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. J. Chem. Technol. Biotechnol. 80, 723-736.

[89] Rosen, M.J., (1989). Surfactants and interfacial phenomena. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, p. 431.

[90] West, C.C., Harwell, J.H., (1992). Surfactants and subsurface remediation. Environ. Sci. Technol. 26, 2324-2330.

[91] Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Eng. Geol. 60, 371-380.

[92] Bliefert, C. & Perraud, R (2001) . Chimie de l'environnement: Air, Eau, Sols, Déchets, Paris-France, de Boeck Diffusion. ISBN: 9782744500862, 496p.

[93] Stumm, W. & Morgan, J. (1996). Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters, NY, États-Unis, J. Wiley. ISBN: 978-0-471-51185-4, 1022p.

[94] Lehninger, Albert L (1975). Biochemistry: The Molecular Basis of Cell Structure and Function. New York: Worth Publishers. p. 894. ISBN 0-87901-047-9.

[95] L'Huillier L. and Edighoffer S., (1996). Extractibility of nickel and its concentration in cultivated plants in Ni rich ultramafic soils of New Caledonia. Plant and Soil, 186, 255-264.

[96] Hery M., Nazaret S., Jaffré T., Normand P. & Navarro E., (2003). Adaptation to nickel spiking of bacterial communities in neocaledonian soils. Environmental Microbiology, 5(1), 3-12.

[97] Jeannot R., Lemière B., Chiron S., Augustin F. & Darmendrail D., (2001). Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Editions BRGM, Orléans, France, 85 pp.

[98] Rollin C. and Quiot F.,(2005). Hydrocarbures aromatiques polycycliques – Guide méthodologique : acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, 99 pp.

[99] Deschamps T., Benzaazoua M., Bussière B., Belem T. & Mbonimpa M.,(2006). Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols

contaminés et des déchets industriels. *VertigO, la revue en sciences de l'environnement*, 7(2), 1-11.

[100] Lemière B., Seguin J.J., Le Guern C., Guyonnet D., Baranger P., Darmendrail D. and Conil P.,(2001). Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Applications dans un contexte d'Evaluation Détaillée des Risques pour les ressources en eau. Bureau de Recherches Géologiques et Minières, 122 pp.

[101] Nowak C., Mossmann J.R. & Saada A., (2003). Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle : mécanismes et mise en oeuvre. Bureau de Recherches Géologiques et Minières, 101 pp.

[102] M. Dietrich Klinghardt, (1998). Les métaux lourds et leurs effets sur la santé, Conférence à L'Ecole Polytechnique de Zurich.

[103] P. Duverneuil, B. Fnouillet, C. Chaffot, (1997). Récupération des métaux lourds dans les déchets et boues issues des traitements des effluents, État de l'art, Édition Lavoisier Technique et Documentation. Paris.

[104] H. Muftah El-Naas, Sulaiman Al-Zuhair, Aanal Abu Alhaija, (2010) . Removal of phenol from petroleum refinery wastewater through adsorption on date-pit activated carbon, Chemical Engineering Journal. United. Arab. Emirates. 162 997-1005.

[105] J. Rodier, C. Bazin, J. P. Broutin, P. Chambon, H. Champsaur, L. Rodi, (1996). L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires et eaux de mer, 8éme Édition.

[106] R. Djeribi, (2005) . Etude de l'adsorption de quelques ions métalliques sur charbon actif et effets des ultrasons sur leur désorption, Mémoire de Magister : Spécialité : Chimie physique et analytique Université d'Annaba.

[107] J. F. Blais, S. Dufresnes, G. Mercier, (1999). État du développement technologique en matière D'enlèvement des métaux des effluents industriels, Revue des sciences de l'eau 12. 687-711.

[108] R. Perrin, S.P. Schorff, (1997). Chimie industrielle, 2ème Edition Masson.

[109] Raina M. (1995). Miller Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. Environ Health Perspect. 103 (Suppl 1) : 59-62.

[110] Tan, H.-M., and J. R. Mason, (1990) . Cloning and expression of the lasmidencoded benzene dioxygenase genes from Pseudomonas putida ML2. FEMS Microbiol. Lett. 72:259-264.

[111] Ferhat Samira, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Kamel Eddouaouda, Redha Alouaoui, Ahmed Boucherit, Najla Mhirib, Nadji Moulai-Mostefa, Sami Sayadi (2011). Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by Ochrobactrum sp. 1C and Brevibacterium sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. International Biodeterioration & Biodegradation 65, pp.1182 – 88.

[112] Bury, S. J., and C. A. Miller, (1993). Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. 27:104–110.

[113] Ruey-an Doong, Wen-gang Lei (2003). Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. Journal of Hazardous Materials B96 15–27.

[114] Benjamin, M. M. et Leckie, 1. O. (1981). Multiple-site adsorption of Cd, Cu, Zn, and Pb on amorphous iron oxyhydroxide. Journal of Colloid and Interface Science. vol. 79, no 1, p. 209-221.

[115] Burlage.R.S, Hooper.S.W and Sayler.G.S, (1989). The tol (pwwo) catabolic plasmid. Appli.Environ.Microbiol. 55. 1323-1328.

[116] J.W. Wong, M. Fang, Z. Zhao, B. Xing, (2004). Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions, J. Environ. Qual. 33, 1947–1953.

[117] K. jagajjanani Rao and Santanu Paria (2009). Solubilization and Biodegradation of Naphthalene in Presence of Sapindus Mukorossi - Synthetic Mixed Surfactant Systems. Journal of physical chemistry.B, 113,474-881.

ANNEXE A 1: Matériels utilisés dans les expériences

Instruments	Modèle	Compagnie
Etuve	D.91126Schwabach FRG	MEMMERT ,Gmbh+Co.KG.Germany
Tensiomètre à anneau	D78532 Tuttlingen	Germany
Spectrophotomètre UV Visible Mini 1240	Shimadzu	JAPON
Plaque chauffante agitateur	IKA-combimag	IKA-combimag RCT.Germany
Centrifugeuse	D78532 Tuttlingen	Hettich.Zentrifugen Germany
Balance	Iten NO ARRV70	OHAUS-chine
incubateur shaker		
Autoclave	Adolf Wolf Sano clav	Germany

ANNEXES A2 : Réactifs utilisés

Réactif	Forme chimique	Pureté	Origine
Dihydrogéno Phosphate de sodium	Na_2HPO_4	98.5%	Sigma-Aldaich
Sulfate de magnésium	$MgSO_4.7H_2O$	99%	Sigma-Aldaich
Chlorure de sodium	Na Cl		Scharlau
Chlorure de calcium	$CaCl_2$	98%	Riedel-de Haen
Dihydrogéno Phosphate de potassium	KH_2PO_4	98%	Sigma-Aldaich
Sulfate de fer hydraté	$FeSO_4 .7H_2O$	99%	Riedel-de Haen
Sulfate de zinc hydraté	$ZnSO_4.H_2O$	99.5%	Riedel-de Haen
soja triptona (TSA), Agar	/		España
Sulfate de manganèse	$MnSO_4 .4H_2O$	99%	Riedel-de Haen
Sulfate de cuivre	$CuSO_4.5H_2O$	98%	Riedel-de Haen
Sulfate de nickel	$NiSO_4.6H_2O$	99%	Signa-Aldrich
Chlorure de cobalt	$CoCl_2 .6H_2O$		
Acide borique	H_3BO_3	99%	Fluka
Gasoil	/	98%	Riedel-de Haen
Extrait de levure	/		España
Acétone	C_3H_6O	99%	Fluka
Naphtalène	$C_{10}H_8$	99%	Riedel-de Haen
dodécyl sulfate de sodium (SDS)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	85%	España
Tween 80	$C_{64}H_{125}O_{26}$	98%	Fluka
Charbon actif	/	99%	Riedel-de Haen
Chlorure d'Ammoniac	NH_4Cl	99.8%	Riedel-de Haen